


# **Estudio de la interacción de bacterias implicadas en la formación de placa dento-bacterina con superficies de titanio comercialmente puro *in vitro* y su asociación con la peri-implantitis.**

Memoria de Tesis presentada por:

***MCO. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández***



Para optar por el grado de Doctor por la  
Universitat Politècnica de Catalunya

Dirigida por:

Dr. Francisco Javier Gil Mur  
Dra. Elisabeth Engel

Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica  
Universitat Politècnica de Catalunya

## Capítulo

### 3.

**Adhesión microbiana a  
superficies de titanio  
comercialmente puro**  
(Implicación en la enfermedad  
peri-implantar)

*“No estudio para saber más, si no para ignorar menos”  
Sor Juana Inés de la Cruz (1648-1695)*

### **3.1.INTRODUCCIÓN**

#### **3.1.1. Peri-implantitis**

La periodontitis está considerada dentro de las enfermedades definidas como enfermedades periodontales, las cuales básicamente se han referido en sentido estricto a gingivitis y periodontitis. La gingivitis ha sido definida como una condición inflamatoria de los tejidos blandos de alrededor del diente y se sabe que es una respuesta inmune directa a la placa dentobacteriana sobre la superficie dental. La periodontitis sigue a la gingivitis y ésta también presenta una respuesta inflamatoria e inmune específica. Ésta se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente incluido el ligamento periodontal, el hueso y los tejidos blandos, los cuales muchas veces pueden ser la causa de pérdida dental.

Por otro lado la peri-implantitis presenta similitudes con la periodontitis, tales como la presencia de bacterias [SBN99], infección localizada, movilidad y en el diagnóstico radiológico una zona radiolúcida (como indicación de pérdida ósea) y es generalmente descrita como una condición inflamatoria de los tejidos alrededor de un implante dental (asociada a la presencia de placa dentobacteriana sobre la superficie), la cual inicia con la destrucción de los tejidos blandos y la posterior destrucción del hueso peri-implantar. [BOR05] [FRS05] De igual forma que el diente provee un sustrato para la colonización microbiana, la superficie del aditamento transmucoso de los implantes dentales se ve afectado por la misma causa.

#### **3.1.2. Bacterias implicadas en el desarrollo de la enfermedad periodontal y peri-implantar.**

En la cavidad oral se desarrollan muchos microorganismos (se dice que puede llegar a niveles de  $10^{10}$ /UFC por gramo en el sarro dental) presentando una gran biodiversidad y que pueden colonizar diferentes ambientes bucales (carrillos, lengua, dientes, encías, paladar). Entre los tipos más habituales de la flora bucal se encuentran los estreptococos, que se localizan tanto en dientes como en la saliva. También se encuentran una gran cantidad de bacterias anaerobias estrictas (asociadas a la alta tasa metabólica que tiene lugar en la boca, lo que genera los ambientes necesarios para su supervivencia) y especies de los grupos de neiserias,

estafilococos e incluso *Vibrio* [SLO78]. Todas estas bacterias se encuentran formando biofilms, comúnmente llamada placa dentobacteriana.

La placa dentobacteriana esta directamente ligada a diversos padecimientos bucodentales, tales como caries y diversas enfermedades periodontales. Black fue el primero en describir la presencia de una masa gelatinosa sobre la superficie de los dientes (Figura 3.1), resultado de la acumulación de cientos de diversas especies coexistiendo en un único nicho ecológico. Aunque existen diferencias en cuanto a composición y tipos bacterianos entre zonas de la boca (por ejemplo zona retromolar o vestibular) o incluso entre el mismo diente (supragingival ó subgingival; incisal o cervical), el *papel* de la placa como un agente etiológico en problemás periodontales esta bien establecido. [ROS00]



**Figura 3.1.** Fotografía de la acumulación de placa dento-bacteriana en la región mandibular, en la cual se puede apreciar una encía inflamada, eritematosa.

Se han realizado varios estudios para aislar e identificar las bacterias asociadas a enfermedades periodontales en pacientes y se han encontrado una gran variedad de bacterias implicadas entre las que destacan las bacterias Gram-negativas tales como bacilos y espiroquetas que al mismo tiempo han estado asociados a la peri-implantitis causando la pérdida apical progresiva de hueso, resultando en la pérdida del implante [WOO04].

Wade y colaboradores [WAD05], realizaron cultivos de la flora bacteriana de diversas enfermedades bucales como la caries, infecciones endodónticas y periodontitis, obteniendo placa subgingival de bolsas periodontales de 8 mm de profundidad en dos individuos. De esto aislaron 3592 clones clasificados en especie, de los cuales 62 fueron encontrados en las lesiones endodónticas, 98 en las lesiones



cariosas mientras que las muestras periodontales mostraron la más amplia gama de especies con 161. Y a su vez se encontró que 15 estaban asociadas tanto a caries como a infecciones endodónticas, 17 asociadas a caries y enfermedad periodontal y 21 cepas estuvieron presentes en enfermedad periodontal e infecciones endodónticas. Sólo 4 cepas fueron encontradas en los tres problemas. De las 161 (Fig. 4-3) bacterias asociadas a enfermedades periodontales, las más comunes en diferentes estadios de dicho padecimiento se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter* (formalmente *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*. [BBF05] [KLY05] [MSS05] [TAN99] [WTR96] [SKE05]

La presencia de bacterias patógenas y la formación de la placa dento-bacteriana sobre una superficie esta relacionada con la adhesión de ciertas especies que actúan como pioneras y se adhieren directamente a dichas superficies. Algunas especies incluyen streptococcus orales y actinomicas, donde los estreptococos representan más del 80% de los colonizadores primarios. [GMS99]

#### **3.1.2.1. Colonizadores primarios**

La mejor forma para iniciar un estudio de formación de los biofilms, ha sido el clásico estudio de Ritz, en el cual muestreos de placas dento-bacterianas son removidos y sembrados periódicamente durante varios días. Estos estudios indicaron claramente una progresión de organismos (con los estreptococos siendo la especie pionera y el subsecuente incremento proporcional de actinomyces) y eventualmente la conversión de la placa en una comunidad madura con altos niveles de organismos filamentosos Gram-negativos. [ROS00]

Se cree que muchos de los llamados colonizadores primarios (entre los cuales se encuentran los streptococci y los bacilos Gram-positivos) [RGH03] [ROS00], reconocen componentes de la película adquirida (una delgada cubierta que cubre la superficie del diente y que consiste primordialmente de glicoproteínas, mucinas y enzimas propias de la saliva) [KOL93]. Otras teorías indican que la adhesión bacteriana es el resultado de interacciones específicas e inespecíficas bacteria-implante, indicando que la adhesión de las bacterias a las superficies sólidas dependen de muchos factores y está gobernada por diversas interacciones tales como la energía libre de superficie, la hidrofiliidad y las interacciones físico-químicas (fuerzas de van der Waals, interacciones Lewis ácido-base e interacciones electrostáticas) [ABB06] [PFB07].

*Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) es una bacteria Gram-positiva que ha sido reconocida desde hace mucho tiempo como una llave importante en la colonización de la cavidad oral [MPM04] [RGH03] [ROD00]. Como muchos streptococcus orales, esta bacteria produce alfa-hemólisis en placas de agar-sangre, una característica ligada a la habilidad de los estreptococos viridans de oxidar la hemoglobina dentro de los eritrocitos por la secreción de  $H_2O_2$ . *S. sanguinis* se une directamente a los dientes humectados con saliva [ROS00]. Una vez adherida, *S. sanguinis* (entre otros pioneros) sirve de soporte para la adhesión de otros microorganismos orales que colonizaran la superficie del diente formando la placa dento-bacteriana y contribuyendo al desarrollo de enfermedades periodontales. Pero no sólo su patogenicidad esta limitada a la cavidad oral ya que los streptococcus viridans son la causa más común de endocarditis valvular nativa, y en esta enfermedad *S. sanguinis* es el streptococcus viridans más comúnmente implicado en esta afección [XAK07].

Al mismo tiempo *L. salivarius* (entre otros Lactobacilos, como *L. casei* y *L. fermenti*) puede encontrarse en saliva, sobre los dientes, sobre el dorso de la lengua, en la mucosa vestibular y en el paladar duro, donde la proporción de éstas en la saliva es de entre 10 y 100 veces más en comparación con las adheridas a la superficie de los dientes (directamente asociada con el proceso carioso [PSR09]), e igual a la cantidad encontrada sobre las superficies epiteliales (mucosa vestibular, paladar) [HGP72]. Aunque se ha mencionado la deficiente habilidad de los lactobacilos en formar biofilms por si sólo (ver capítulo 1), ya que es necesaria la presencia de *Actinomyces naeslundii* para facilitar su congregación dentro de la placa-dento-bacteriana, la habilidad de producir, tolerar o utilizar el ácido láctico (producto metabólico de estas bacterias) es importante en la formación y mantenimiento de la placa dento-bacteriana. [FAS04]

Físicamente, la adhesión bacteriana y su retención ocurre en cuatro fases: transporte de las bacterias hasta la superficie, adhesión inicial, anclaje por interacciones específicas y finalmente la colonización de la superficie. La adhesión inicial y la retención son físico-químicamente posibles porque una bacteria y una superficie interactúan una con la otra a una cierta distancia (aproximadamente 50 nm) a través de una combinación entre fuerzas atractivas de van der Waals y fuerzas electrostáticas. [SCH94]

La retención preferencial ocurre sobre superficies rugosas, ya que una bacteria en cualquier superficie estará más protegida contra fuerzas compartidas y puede, por lo tanto, tener el tiempo necesario para entrar en contacto directo o acortar la distancia sobre la superficie. [BLQ97]

### **3.1.2.2. Maduración de la placa dento-bacteriana (papel de los colonizadores secundarios)**

Una vez que los colonizadores primarios se han establecido, la propiedad de coagregación es muy específica siguiendo una sucesión entre colonizadores primarios y secundarios. Múltiples estudios han establecido que la cuantificación de la proliferación de los microorganismos adheridos inicialmente para la mayor parte de la masa microbiana aumenta durante la formación temprana de la placa dento-bacteriana. Ésta puede explicar la importancia de la rugosidad superficial en la formación inicial de placa dento-bacteriana [BLQ97], su implicación en la adhesión inicial de los colonizadores primarios, la congregación de secundarios llegando a formarse una placa dento-bacteriana madura.

Como ya se menciono los streptococos son una de las primeras bacterias en colonizar la película adquirida, las cuales llevan a cabo un mecanismo de coagregación entre ellas mismas (colonizadores primarios), más no con los colonizadores secundarios. Sin embargo *Porphyromonas gingivalis*, un colonizador secundario [ROS00], puede coagregarse con el colonizador primario *Streptococcus gordonii*. Al mismo tiempo, colonizadores secundarios que suelen coagregarse con *Fusobacterium nucleatum* (que por un lado, se congrega con los colonizadores primarios y que ayuda a la congregación de los colonizadores secundarios), no lo pueden hacer con algún otro, por lo que esta bacteria es considerada como un puente entre organismos, ya que este puede coagregarse tanto con colonizadores primarios (*S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. mitis*), como con colonizadores secundarios. En ausencia de *F. nucleatum*, muchos otros colonizadores secundarios no pueden llegar a formar parte de la placa dento-bacteriana. Además de estos, muchos colonizadores secundarios anaerobios, no pueden sobrevivir en el estado planctónico sin la coagregación de *F. nucleatum*. Todo esto ha llevado a la conclusión de que la multiplicidad de su coagregación, *F. nucleatum* juega un papel importante como un puente entre microorganismos, siendo un organismo esencial en el desarrollo y maduración de la placa dento-bacteriana. [RGH03] [ZIR07]

Reducir la formación de biofilms sobre las superficies de implantes para aumentar el éxito de los tratamientos es un tema de suma importancia, tanto a nivel de investigación básica como a nivel clínico y hospitalario. El conocer las propiedades de superficie y como influyen en la colonización de bacterias, ha llevado a buscar la forma de evaluar su comportamiento y una vía posible es la cuantificación de las bacterias adheridas y su crecimiento sobre la superficie de los biomateriales.

### **3.1.3. Ensayos de adhesión**

Múltiples estudios usando diferentes técnicas se han enfocado en la cuantificación de bacterias adheridas sobre superficies inertes, otros tantos han usado contadores electrónicos de partículas o la recolección de bacterias después de diluciones con poco éxito debido a su baja reproducibilidad. Actualmente estudios a favor de usar la observación directa de las bacterias adheridas por Microscopia de - Contraste de Fase, Microscopia de Fluorescencia, Microscopia Confocal, Microscopia Laser, ensayos radiométricos o Microscopia Electrónica de Barrido, son ampliamente utilizados. Según Grivet M. y colaboradores (entre otros), un conteo directo de muestras teñidas con naranja de acridina o FDA (Diacetato de fluoresceína) para Microscopia Óptica de Epifluorescencia, puede ser un método “fácil” y “reproducible”, donde además de la observación, la cuantificación es complementada con métodos de análisis de imágenes [GMS99] [MPM04].

Nuestras primeras observaciones mostraron que estos métodos son de baja reproductibilidad, ya que por un lado la distribución de bacterias sobre las superficies no es uniforme, no existe un criterio uniforme para definir como cuantificar las bacterias, es decir, por unidad celular, por agrupación (en el cual no hay seguridad en el número de células reales, debido a la posibilidad de que unas bacterias se encuentren directamente sobre otras) y por otro lado, esta técnica sólo es utilizable para muestras que presentan una superficie lisa; las muestras con una rugosidad mayor a la profundidad de campo del microscopio empleado, dificulta la cuantificación.

Tomando en cuenta que los métodos anteriores no permiten una correcta evaluación de adhesión bacteriana sobre nuestras superficies (especialmente en las que la rugosidad dificulta la observación), es importante considerar la utilización de la metodología básica empleada en microbiología para este fin y tratar de utilizarlos en el conteo de bacterias sobre las superficies.

### 3.1.4. Detección y medida del crecimiento bacteriano

Existen diferentes sistemas de detección del crecimiento de microorganismos en medios líquidos, siendo los principales: recuento directo, medida de la masa de células, recuento de viables, medida del número de partículas, medida de parámetros bioquímicos y medida de la actividad metabólica.

- **Recuento directo:** consiste en la observación al microscopio en cámaras de Petroff-Hausser el número de bacterias, donde la concentración mínima debe ser  $10^5/\text{ml}$ .
- **Medida de la masa de células:** el sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo, la cual depende de la masa en suspensión y por lo tanto midiendo la turbidez, se puede estimar la masa en suspensión. De igual forma la cantidad de células mínima debe ser de  $10^5/\text{ml}$ .
- **Recuento de viables:** consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una UFC (Unidad Formadora de Colonias).
- **Medida del número de partículas:** usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas.
- **Medida del parámetros bioquímicos:** cantidad de ADN o ARN, proteínas peptidoglicanos etc. por unidad de volumen.
- **Medida de actividad metabólica:** un ejemplo sería medir la disminución del potencial redox del medio en que se encuentran como consecuencia del consumo de oxígeno (uso de colorantes sensibles a oxidación-reducción tales como el azul de metileno).

#### 3.1.4.1. Ciclo de crecimiento de poblaciones

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano, como se aprecia en la figura 3.2, las cuales son:

- **Fase lag o de adaptación:** Etapa en la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.
- **Fase exponencial o logarítmica:** Etapa en la que la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. Esta fase corresponde a la de infección y multiplicación dentro del organismo del agente infeccioso.
- **Fase estacionaria:** Durante esta etapa no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias. Los microorganismos pueden entrar en fase estacionaria por varias razones:
  - Debido a la falta de nutrientes esenciales en el medio;
  - Por que los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano
  - Por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento.
- **Fase de muerte:** Etapa final donde se reduce un considerablemente el número de bacterias viables del cultivo. [SIW96]



**Figura 3.2.** Representación gráfica de las cuatro fases presentes durante un cultivo bacteriano, donde la fase estacionaria está directamente relacionada con el periodo de producción de metabolitos o toxinas que tendrán influencia en infecciones o intoxicaciones. [SIW96]

### 3.2. OBJETIVOS

Debido al papel que juegan las bacterias en el éxito o fracaso de los tratamientos con implantes dentales, es importante conocer la interacción de bacterias implicadas en la enfermedad peri-implantar con diversas superficies de titanio comercialmente puro, por lo que el objetivo general de este capítulo es:

- Estudiar la interacción de bacterias (colonizadores primarios) con superficies de titanio.

Específicos.

- Evaluar las propiedades de los microorganismos (*S. sanguinis* y *L. salivarius*)
- Evaluar la tendencia de adhesión tanto de *S. sanguinis* como de *L. salivarius* sobre diversas superficies de titanio comercialmente puro
- Cuantificar el número de bacterias adheridas por unidad de área sobre las diferentes superficies de titanio.
- Relacionar el número de bacterias adheridas por unidad de área con las propiedades de superficie de las muestras de titanio y del propio microorganismo.

### 3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1. Superficies de titanio

Todos ensayos de adhesión bacteriana sobre superficies de titanio comercialmente puro se realizaron por triplicado sobre discos (5 mm de diámetro y 2 mm de espesor) con 6 superficies diferentes previamente caracterizadas (Ver capítulo 2 para más especificaciones) como se indica en la Tabla 3.1.

#### 3.3.2. Bacterias

Para estos ensayos se emplearon dos cepas bacterianas, comunes a la cavidad oral, *Streptococcus sanguinis* (CECT 480) y *Lactobacillus salivarius* (CECT 4063), proporcionados por el Centro de Cultivos Tipo de Valencia, España. Ambas bacterias se mantuvieron y resembraron en medio sólido, específico para cada cepa. *L. salivarius* se resembraba en placas de agar-MRS (Tabla 3.2), mientras que *S. sanguinis* era mantenida en placas de agar-Todd-Hewitt (Tabla 3.3).

##### 3.3.2.1. Caracterización del ciclo de crecimiento de poblaciones

Previo a los ensayos de adhesión sobre los discos de titanio, se inocularon ambas cepas en medio líquido (MRS broth para *L. salivarius* y Todd-Hewitt broth para *S. sanguinis*) y se incubaron a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> para observar su ciclo de crecimiento midiendo por un lado, la turbidez del medio a 600 nm y por otro cuantificando el número de células viables, resembrandolas en medio sólido.

##### 3.3.2.2. Propiedades de superficies de *S. sanguinis* y *L. salivarius*

La adhesión microbiana a superficies sólidas es un paso importante en los procesos infecciosos en los implantes protésicos y de manera general en la formación de biofilms. Para entender este proceso la técnica de MATS (Microbial Adhesion to Solvents) facilita la obtención de información acerca de la carga y la relativa hidrofobicidad de las bacterias, la cual parte de la comparación entre la afinidad celular microbiana a un solvente mono-polar y un solvente apolar. El solvente monopolar puede ser ácido (aceptor de electrones) o básico (donador de electrones) [BRO96].



**Tabla 3.1.** Superficies de titanio empleadas en los ensayos de adhesión bacteriana

| Nomenclatura | Partícula de granallado (µm)             |
|--------------|--|
| Smooth       | -----                                    |
| Mech         | -----                                    |
| AL2          | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (212-300) |
| AL6          | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (425-600) |
| SI2          | SiC (212-300)                            |
| SI6          | SiC (425-600)                            |

**Tabla 3.2.** Composición del medio de cultivo Todd-Hewitt de Scharlau ® (composición en g/L). El agar se agrega sólo en el caso de trabajar con medio sólido.

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Extracto de carne    | 10        |
| Caseína Peptona      | 20        |
| Glucosa              | 2         |
| Bicarbonato de Sodio | 2         |
| Cloruro de Sodio     | 2         |
| Fosfato de sodio     | 0.4       |
| <b>Agar</b>          | <b>15</b> |

**Tabla 3.3.** Composición del medio de cultivo MRS de Scharlau ® (Composición en g/L). El agar se agrega sólo en el caso de trabajar con medio sólido

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Peptone proteosa     | 10        |
| Extracto de carne    | 8         |
| Extracto de levadura | 4         |
| D(+) Glucosa         | 20        |
| Acetato de sodio     | 5         |
| Citrato Triamonio    | 2         |
| Sulfato de Magnesio  | 0.20      |
| Sulfato de Manganeso | 0.05      |
| Fosfato dipotasio    | 2         |
| Polysorbato 80       | 1         |
| <b>Agar</b>          | <b>15</b> |

El procedimiento que se siguió fue la adaptación de la técnica de MATS de Mabboux y col. [MPM04], en la cual las bacterias se recogieron por centrifugación durante la fase de crecimiento exponencial (6000 rpm por 15 minutos), se lavaron 2 veces con PBS (Phosphate Buffer Solution) 1X y resuspendidas en PBS 1X, posteriormente 10 alíquotas (3ml) de la suspensión de bacterias se colocaron en tubos de ensaye de vidrio ( $\varnothing=10\text{mm}$ ) y se agregaron 400 µl de solvente (hexano, cloroformo y dietil-eter), se incubaron a temperatura ambiente por espacio de 10 minutos y se mezclaron las dos fases con un vortex de 60 segundos. Se dejaron reposar 15 minutos para permitir que las dos fases se volvieran a separar y finalmente se retiró la fase acuosa y se midió su densidad óptica a 550 nm. Para calcular el porcentaje de adhesión microbiana a cada solvente se utilizó la ecuación:

$$(1 - A_1 / A_0) \times 100 \quad (15)$$

Donde:

- $A_1$  es la fase acuosa separada después de la mezcla con el solvente (a 550 nm)
- $A_0$  es la densidad óptica del PBS 1X (a 550 nm).

### 3.3.3. Adhesión de bacterias sobre superficies de titanio

Determinado el comportamiento del cultivo, se procedió a la realización de los ensayos de adhesión con ambas cepas, sobre los discos de Titanio.

Los discos de Titanio se colocaron de manera individual en tubos Eppendorf® de 1,5 ml de capacidad, con un 1ml de medio con bacterias a una concentración aproximada de  $1 \times 10^9$  cells/ml. Se incubaron a 37°C, por espacio de 2 horas.

#### 3.3.3.1.1. Microscopia óptica de epifluorescencia

De acuerdo con el protocolo de Mabboux et al., para la observación de bacterias sobre las superficies, las muestras se colocaron en el medio con bacterias durante la fase exponencial por espacio de 2 horas a 37 °C, lavadas dos veces con PBS 1X. Posteriormente se agregó el naranja de acridina al 1 % a temperatura ambiente por 20 minutos, se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % por espacio de 30 minutos, y finalmente se montaron las muestras con Mowiol sobre portamuestras de vidrio para su observación al MOE. [MPM04]

### 3.3.4. Microscopia Electrónica de Barrido

Para su observación por MEB después del periodo de incubación, las muestras se lavaron cuidadosamente con PBS 1X (dos veces para eliminar las bacterias que no estaban bien adheridas a la superficie y las que habían muerto), se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % por espacio de 30 minutos, pasado el tiempo de fijación se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos 0,1M. Posteriormente se les colocó Tetraóxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ ) por espacio de 1,5 horas, se lavó suavemente con agua

Milli Q 3 veces, se deshidrataron con diversas concentraciones de alcohol (Tabla 3.4) y finalmente una delgada capa de Oro se depositó sobre la superficie para facilitar su interacción con el haz de electrones.

**Tabla 3.4.** Tiempos de deshidratación, para la posterior observación de las muestras por MEB. La solución de alcohol se hizo con agua Milli-Q.

| Alcohol<br>(concentración)<br>% | Tiempo de<br>deshidratación<br>(minutos) | Cambios<br>de Medio |
|---------------------------------|--|---------------------|
| 50                              | 10                                       | 1                   |
| 70                              | 10                                       | 1                   |
| 90                              | 10                                       | 1                   |
| 96                              | 10                                       | 3                   |
| 100                             | 15                                       | 1                   |
| 100                             | 20                                       | 1                   |
| 100                             | 30                                       | 1                   |

#### 3.3.4.1.1. Cuantificación de bacterias sobre las superficies de titanio.

Para cuantificar el número de bacterias por unidad de área, fue necesario el separar las bacterias de las superficies de titanio, sembrar en medio sólido (agar) y contabilizar el número de colonias formadas.

Después del periodo de incubación a 37 °C, las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS 1X para eliminar las células que no estuvieran adheridas a la superficie, se dio un vortex por espacio de 5 minutos y se realizaron las diluciones 1-10 necesarias, posteriormente se sembraron en medio sólido (Todd-Hewitt-agar para *S. sanguinis* y MRS-agar para *L. salivarius*).

Las placas fueron incubadas por 48 horas a 37°C y finalmente se cuantificaron el número de colonias formadas. Los resultados se normalizaron por unidad de área (mm<sup>2</sup>), ya que el área real (ver capítulo 2) en todas las muestras es diferente debido a las variaciones en la rugosidad de cada muestra.

Para calcular el número de bacterias por milímetro cuadrado (UFC/mm<sup>2</sup>) se utilizó la ecuación:

$$UFC/mm^2 = nb / Ar \quad (16)$$

Donde:

- $nb$  es el número de colonias cuantificadas
- $Ar$  es el área real de cada muestra

#### **3.3.4.2. Comparación entre el comportamiento de adhesión sobre titanio y la alúmina**

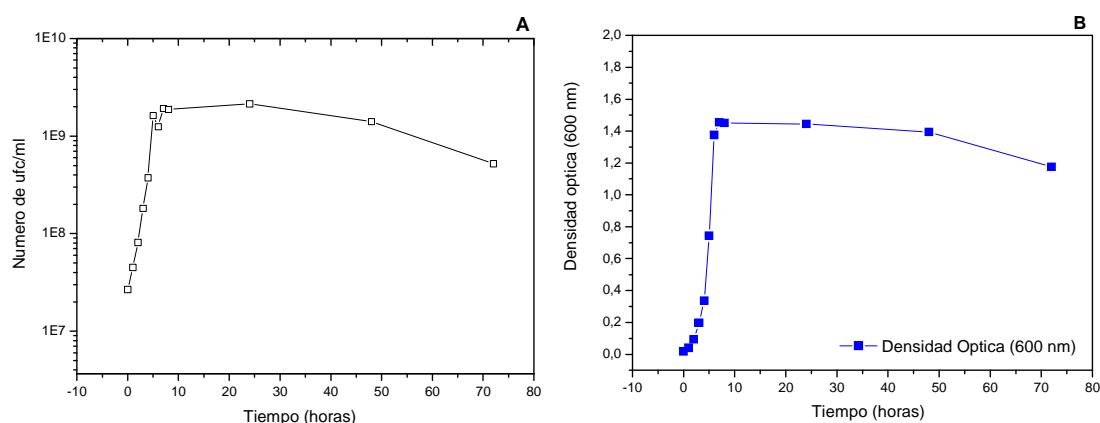
Para analizar si la presencia de la alúmina, ejercía un efecto antibacteriano en los discos de titanio, se cuantificaron el número de bacterias por unidad de área en discos de alúmina con una  $Ra \sim 100$  nm, mientras que los discos de titanio utilizados fueron los Smooth (que presentaban un  $Ra \sim 100$  nm), siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la cuantificación de bacterias desprendidas de las superficie después de 2 horas de incubación a 37 °C, así como la normalización de las mismas por unidad de área.

### 3.4.RESULTADOS

#### 3.4.1. Bacterias

##### 3.4.1.1. Ciclo de crecimiento de poblaciones

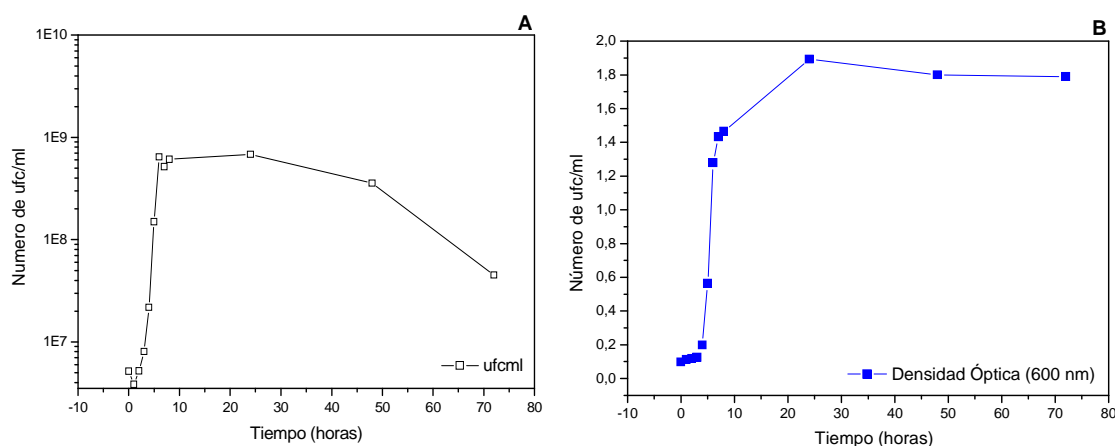
Los resultados de crecimiento y comportamiento de las bacterias en su medio de cultivo, muestran que la fase lag, se da en las primeras 4 horas para ambas cepas. A partir de ese tiempo la fase de crecimiento exponencial se inicia presentando un punto máximo a las 8 horas. Después de este punto el número de células viables se mantiene estable (fase estacionaria) hasta las 24 horas y pasando de aquí, el número de células viables en el medio empieza a disminuir. Mientras tanto la densidad óptica muestra el mismo comportamiento que el recuento de viables alcanzando su máximo punto a las 8 horas para *S. sanguinis* y a 24 horas para *L. salivarius* y de ahí se mantiene constante. (Figuras 3.3 y 3.4).



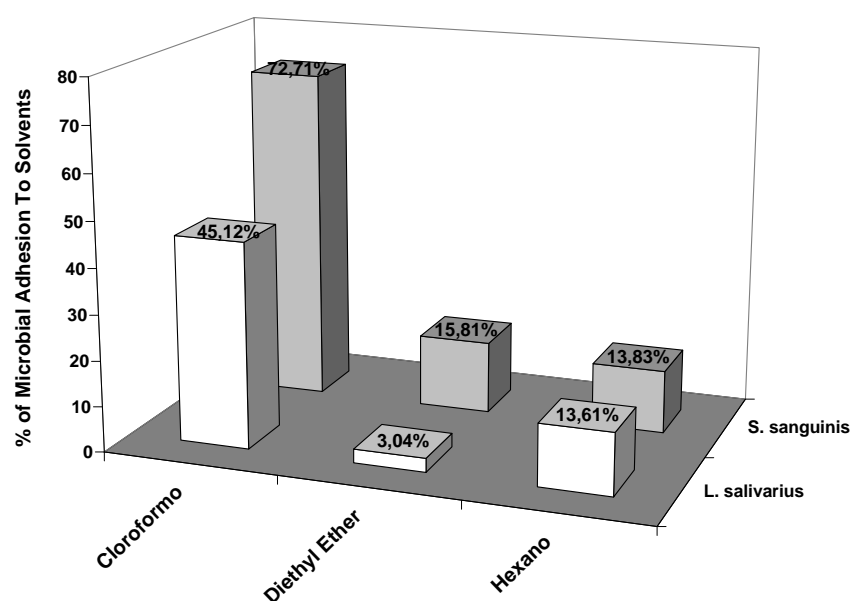
**Figura 3.3.** Curva de crecimiento de *S. sanguinis*, donde se representan por un lado, el número de células viables (A) hasta 72 horas (número de ufc/ml) y por otro lado el (B) crecimiento celular medido por la turbidez del medio (densidad óptica observada a 600nm).

##### 3.4.1.2. Propiedades de superficie de las bacterias

Los resultados de MATS (Figura 3.5), muestran una gran afinidad al cloroformo para ambas cepas, siendo mayor para *S. sanguinis* (72,71%). Mientras tanto la adhesión microbiana a dietil-eter fue baja para ambas cepas, pero *L. salivarius* (3,04%) presentó la menor cantidad de bacterias adheridas. Ambos resultados nos indican la naturaleza donadora de electrones para ambas cepas siendo mayor esta tendencia para *S. sanguinis*. Al mismo tiempo, los resultados de adhesión a hexano fueron bajos para ambas cepas (*S.sanguinis* 13,83 % y *L.salivarius* 13,61%) lo que indica una tendencia hidrofílica de ambas cepas.



**Figura 3.4.** Curva de crecimiento de *L. salivarius*, en A el recuento de células viables y en B se representa el crecimiento de las células, observado por la turbidez del medio.



**Figura 3.5.** Porcentajes de adhesión bacteriana a diferentes solventes (Cloroformo, Dietil-eter y hexano para ambas cepas (*S. sanguinis* y *L. salivarius*).

### 3.4.2. Adhesión bacteriana

#### 3.4.2.1. Imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia (MOE)

Las observaciones de las muestras por MOE, revelaron una gran cantidad de bacterias sobre las superficies Smooth y Mech, pero con grandes diferencias en la distribución, lo cual puede apreciarse claramente sobre estas superficies donde se observan aglutinaciones de bacterias (microcolonias) y en la misma imagen zonas con una menor cantidad. Pero en el caso de las muestras rugosas (AI2, AI6, SI2 y SI6) se presentaron dos dificultades, por un lado aparentemente presentaban una menor cantidad de bacterias sobre la superficie al ser comparadas con las muestras

anteriores las cuales, ya que pudo observarse zonas brillantes, pero con la dificultad de distinguir entre la presencia de bacterias y acumulaciones o precipitados de la tinción. Y por otro lado estas superficies presentaron el inconveniente de la rugosidad, que aunada a la profundidad de campo del microscopio, dificultaba la observación y cuantificación de las bacterias, como se aprecia en la Figura 3.6, por lo que se decidió observar las muestras por medio de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

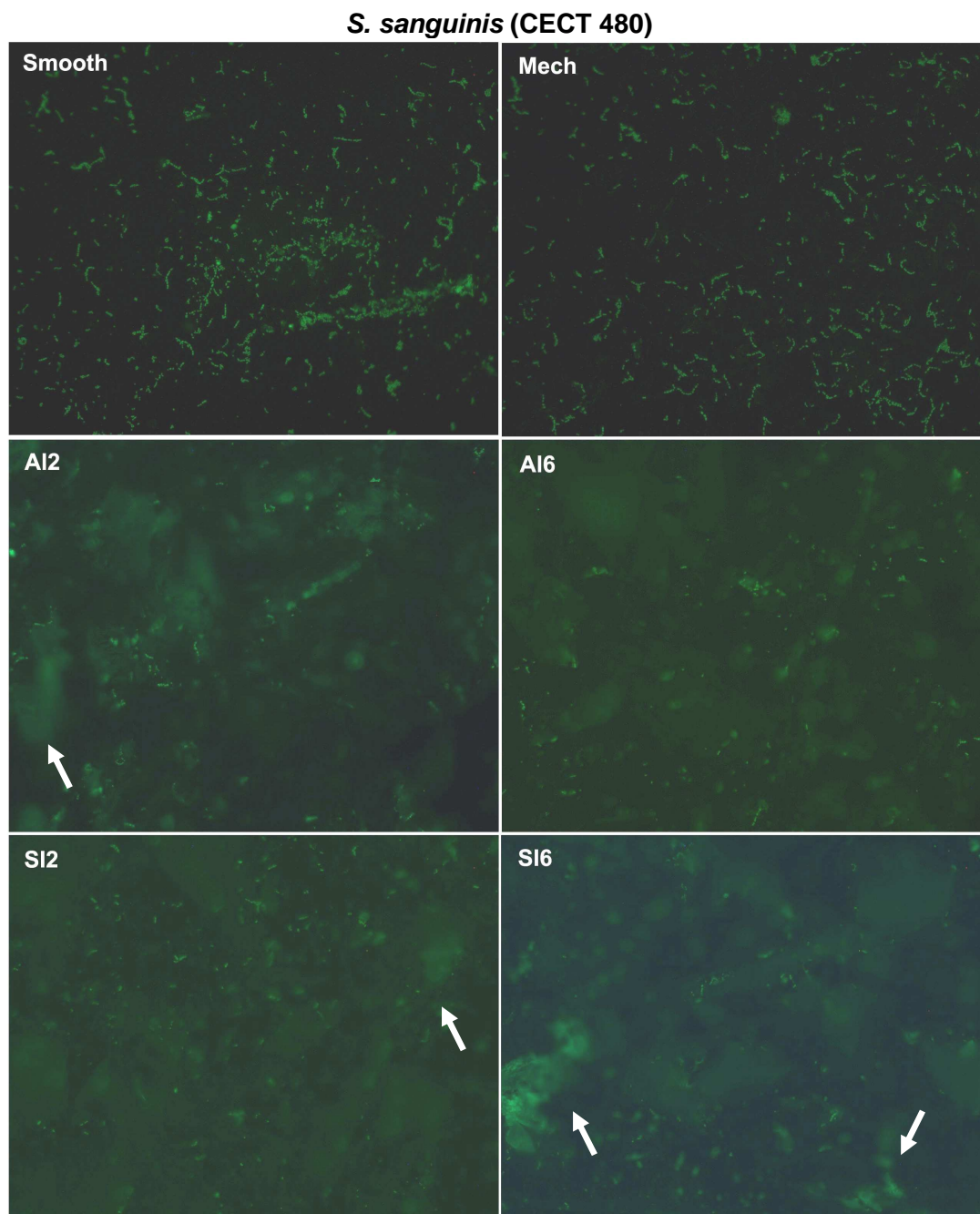
#### **3.4.2.2. Imágenes de microscopia electrónica de barrido (MEB)**

Las primeras observaciones por MEB muestran a *S. sanguinis* (Figura 3.7) y *L. salivarius* (Figura 3.8) sobre las diferentes superficies de titanio. En el caso de *S. sanguinis* es posible observar pequeños grupos de bacterias (principalmente organizadas en cadenas cortas) sobre Smooth, Mech, Al6, Si2 y Si6. Mientras que en la muestra Al2, sólo se observaron células aisladas. Por otro lado las muestras que estuvieron en contacto con *L. salivarius*, muestran una mayor cantidad de bacterias en todas las superficies sin mostrar una adhesión preferencial. La organización que presentaron en todas las muestras fue de pequeños grupos (microcolonias) tanto en las partes más altas en las muestras granalladas con carburo de silicio (Si2 y Si6), como en los valles (o zonas profundas de la superficie). Analizando detalladamente las muestras fue posible observar la presencia de agujeros sobre la superficie Smooth. La presencia de estos hoyos y la cercanía de las bacterias (en especial con *L. salivarius*) a estos, permite suponer una posible asociación entre los productos metabólicos bacterianos y algún tipo de daño de la superficie (Figura 3.8).

#### **3.4.2.3. Cuantificación de bacterias por unidad de área**

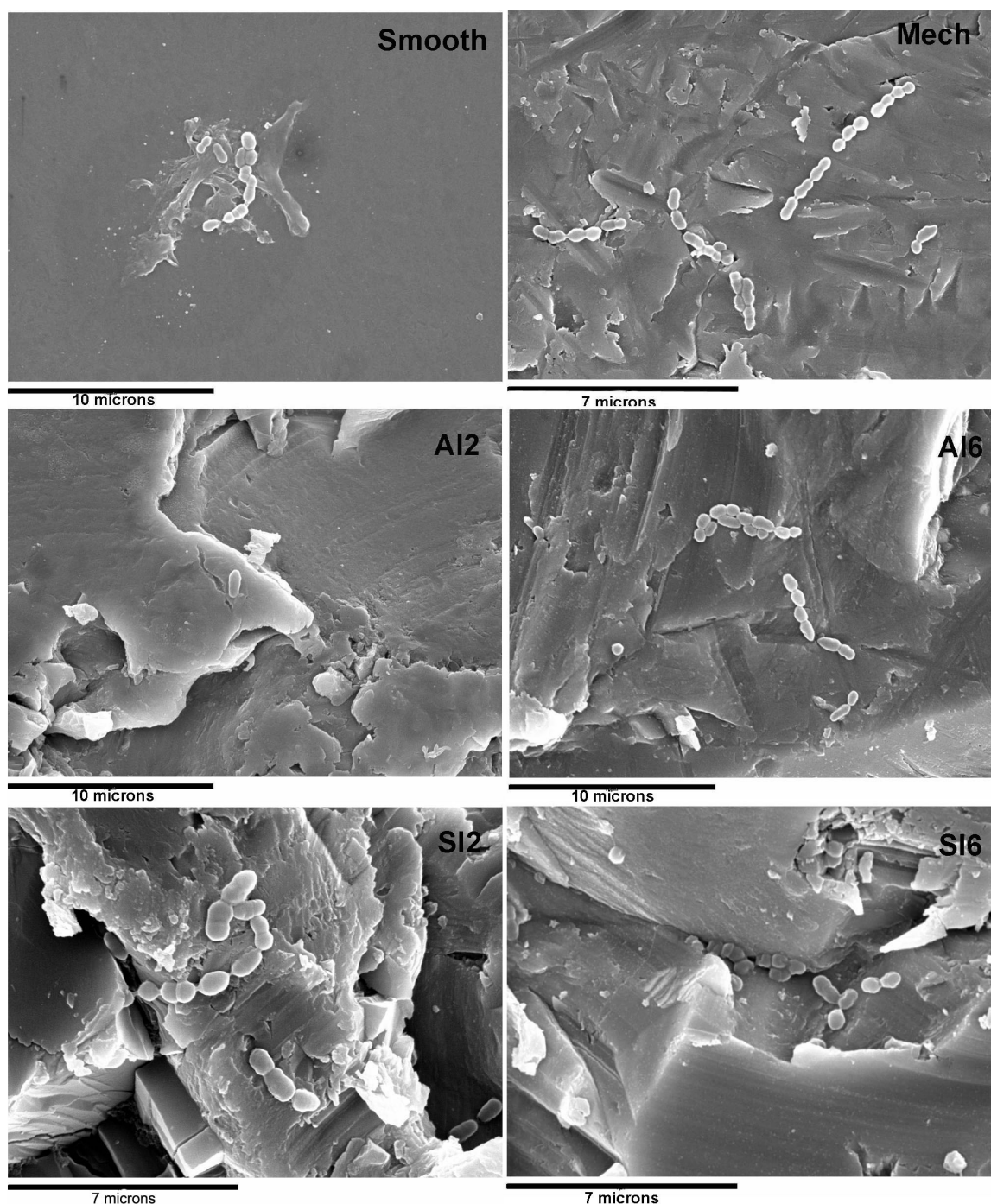
Debido a que las observaciones de las muestras tanto por microscopia óptica de epifluorescencia como por MEB de las superficies de Titanio no proporcionaba por si sólo un resultado comparativo con respecto al número de bacterias sobre las superficies, fue necesaria la cuantificación de las bacterias por  $\text{mm}^2$ , debido principalmente a que en el caso de las superficies rugosas fue prácticamente imposible el cuantificarlas. Después de cuantificar el número de colonias formadas desprendidas de cada superficie y normalizarlas, los resultados obtenidos tanto con *S. sanguinis* como con *L. salivarius* se muestran en las figuras 3.9 y 3.10. En estos resultados se puede observar el comportamiento de *S. sanguinis* inoculado en Todd-Hewitt broth, en el cual de manera general, se observó un menor número de bacterias

en el grupo de muestras granalladas con  $\text{Al}_2\text{O}_3$  en comparación con las granalladas con SIC. En especial para las muestras Al2, la cual presentó un menor número de bacterias por unidad de área comparadas con la superficie SI2 (que presentó unos valores de Ra muy similares a Al2) y con las superficies de menor rugosidad (Smooth y Mech) como se observa en la figura 3.9.

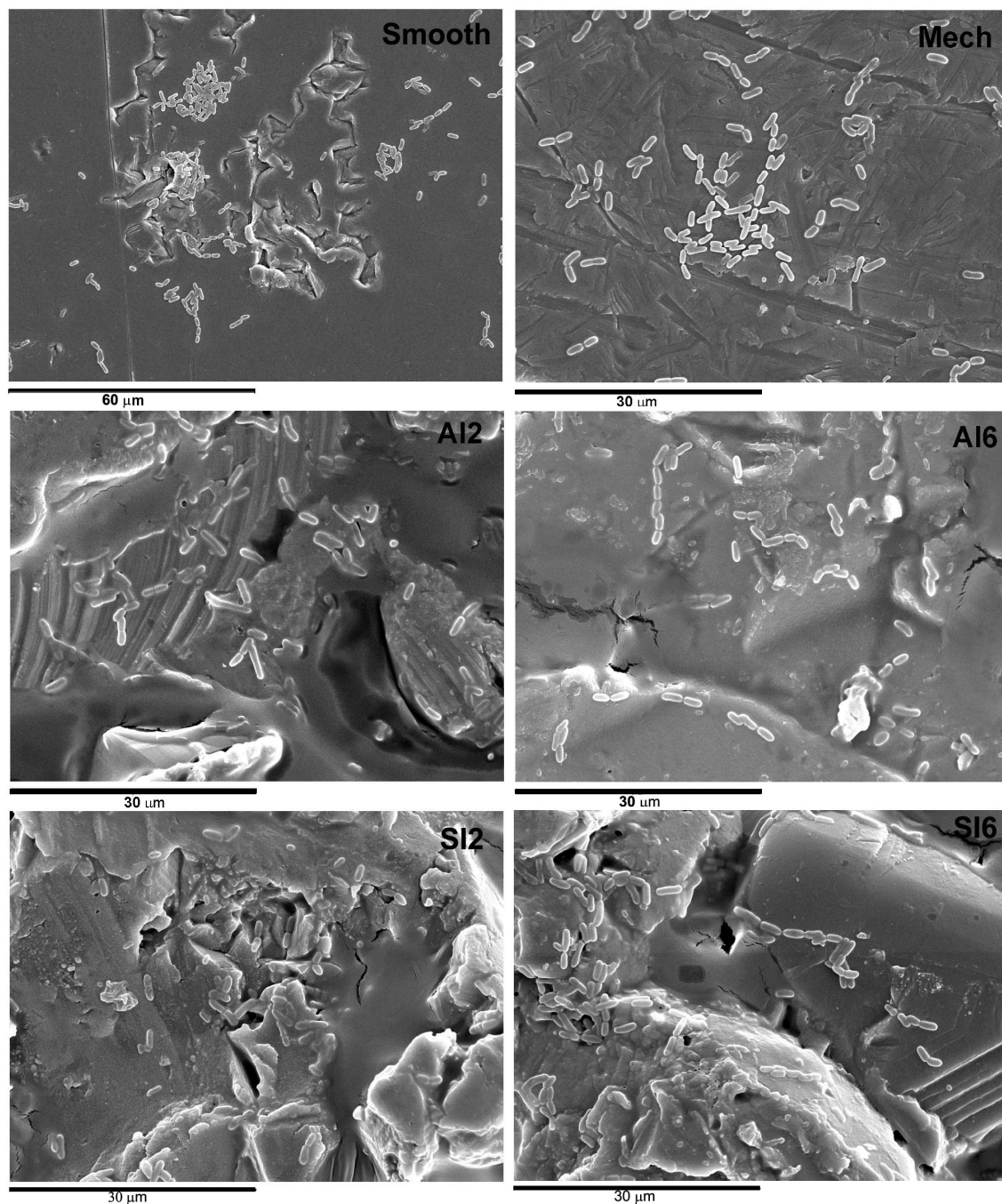


**Figura 3.6.** Primeras observaciones por microscopia de fluorescencia de las muestras de Titanio, posteriores a la incubación (2 horas) con bacterias. Es evidente la dificultad para cuantificar el número de bacterias por área, ya que la distribución no es uniforme. Por otro lado la profundidad de campo del microscopio aunado a la gran rugosidad dificultaba el enfoque de todas las bacterias presentes en cada superficie, además de que los programas de análisis de imagen consideraban en la cuantificación por área las zonas brillantes (indicadas con flechas en Al2, SI2 y SI6).

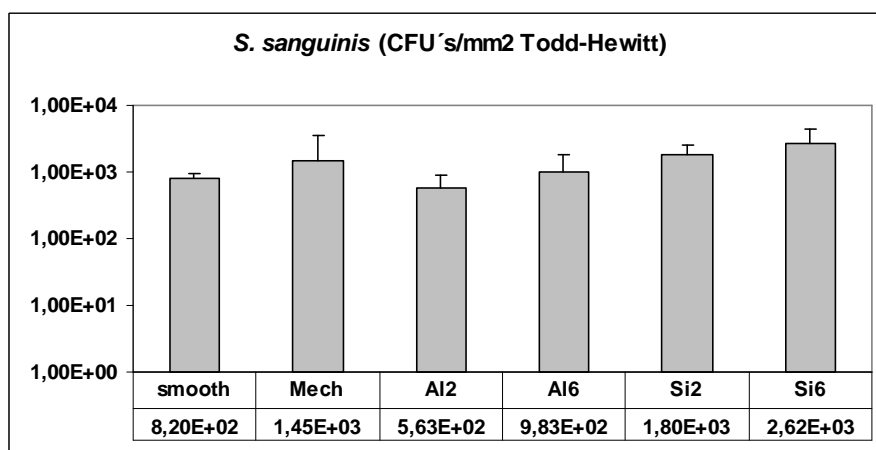


***S. sanguinis* (CECT 480)**

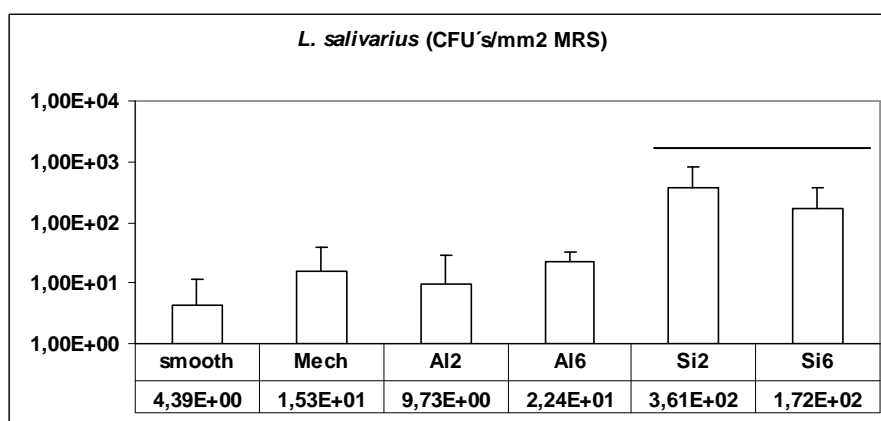
**Figura 3.7.** Superficies de titanio con bacterias (*S. sanguinis*) después de 2 horas de incubación en Todd-Hewitt a 37°C. Es posible observar por un lado la forma de las células y por otro su organización. Además la distribución de las células no parece tener predilección por una zona específica ya que se pueden encontrar adheridas tanto en las partes más elevadas de las muestras rugosas (SI2) como en las partes más profundas de las mismas (SI6).

***L. salivarius* (CECT 4063)**

**Figura 3.8.** Observación en MEB de las diferentes superficies de Titanio después de 2 horas de incubación con *L. salivarius* en su medio de cultivo (MRS). En el caso de esta bacteria, es posible observar una distribución en cúmulos en todas las superficies, además de observar algunos agujeros sobre la superficie de titanio en la muestra Smooth con la presencia de bacterias alrededor y sobre estos defectos. Por otro lado, la presencia de una capa cubriendo la superficie de las muestras y en algunos casos sobre las bacterias, es más evidente en las muestras rugosas (Al2, Al6, SI2 y SI6).



**Figura 3.9.** Resultados de la cuantificación de bacterias (*S. sanguinis*) por unidad de área (UFC/mm<sup>2</sup>) sobre las diferentes superficies estudiadas, donde se puede apreciar claramente que el grupo de muestras granalladas con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, presenta un menor número de bacterias por milímetro cuadrado, e incluso la muestra Al2, presentó los mejores resultados incluso que las muestras de menor rugosidad Smooth y Mech.



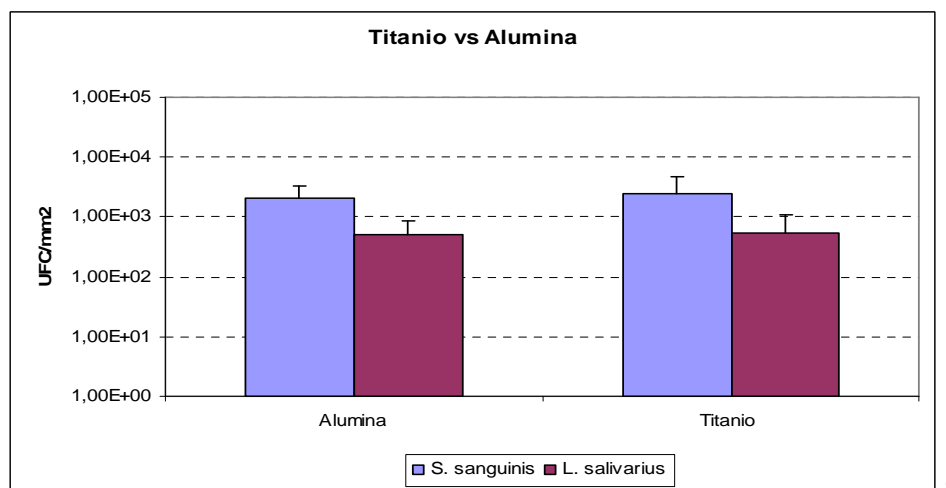
**Figura 3.10.** Cuantificación de bacterias (*L. salivarius*) por unidad de área (UFC/mm<sup>2</sup>), donde las muestras granalladas con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> presentaron un menor número de bacterias por milímetro cuadrado comparadas con las granalladas con SiC. Pero en este caso, la muestra Smooth (Ra ~100 nm) presentó un menor número de bacterias.

Por otro lado, los resultados obtenidos con *L. salivarius* presentaron una mayor cantidad de UFC/mm<sup>2</sup> en las superficies granalladas con carburo de silicio, en comparación con el resto de muestras. En este caso las superficies granalladas con alúmina (Al2 y Al6) que tenían valores de Ra de entre 2 y 3 µm, presentaron una tendencia de adhesión similar con las muestras no granalladas (Smooth y Mech) las cuales tuvieron un valor de Ra por debajo de los 350 nm (Figura 3.10).

#### 3.4.2.4. Comparación entre el titanio y la alúmina.

Al observar la marcada tendencia en el menor número de bacterias por unidad de área en las muestras granalladas con alúmina, se decidió observar cual era el

comportamiento de adhesión tanto de *S. sanguinis* como de *L. salivarius* sobre la superficie de una muestra de alúmina pura con una rugosidad similar a Smooth. Los resultados obtenidos, no mostraron diferencias entre las muestras de titanio y alúmina para ambas cepas bacterianas, como se puede observar en la Figura 3.11.



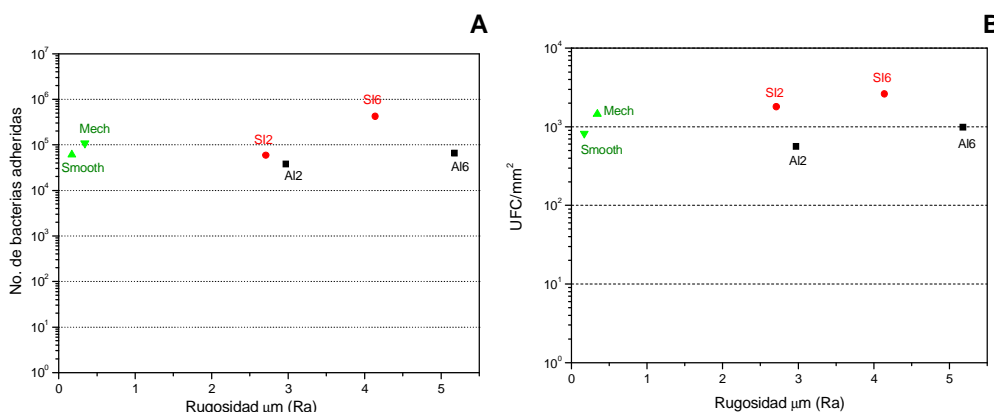
**Figura 3.11.** Comparación entre el número de UFC/mm² entre el titanio y la alúmina.

#### 3.4.2.5. Comportamiento de adhesión bacteriana

El número de UFC/mm², se representaron en función de la Rugosidad (Ra), Energía superficial (total y sus componentes polar y dispersiva) tanto para *S. sanguinis* como para *L. salivarius*. En la figura 3.12 se representaron en A, el número de bacterias cuantificadas para cada una de las superficies y en B se muestran los resultados del número de bacterias por unidad de área.

En el primer caso se puede observar como el número de bacterias adheridas es mayor en el caso de la muestra Smooth, incluso comparada con las superficies rugosas, donde además se puede observar una división de comportamiento marcado por el tipo de partícula empleada, mientras las superficies granalladas con valores de Ra ~2 µm (Al2 y Si2) presentan los mismos resultados de adhesión bacteriana, conforme la rugosidad aumenta la diferencia de adhesión determinada por la partícula empieza a evidenciarse, ya que la superficie granallada con carburo de silicio (Si6) presentaron un mayor número de bacterias en comparación con la superficie Al6, encontrando hasta una diferencia de un orden de magnitud. Por otro lado, en la figura 3.12-B, los resultados previamente normalizados por unidad de área al ser graficados nuevamente en función de la Rugosidad (Ra), muestran este mismo comportamiento. Se puede observar como los valores de UFC/mm², sobre las superficies granalladas

con carburo de silicio se encuentran un orden de magnitud por encima de las superficies granalladas con alúmina. Y al mismo tiempo los resultados obtenidos sobre las superficies con valores de Ra menores a 300 nm (Mech y Smooth) presentaron valores de adhesión iguales que Al2 en el caso de Smooth y mayores en el caso de Mech.



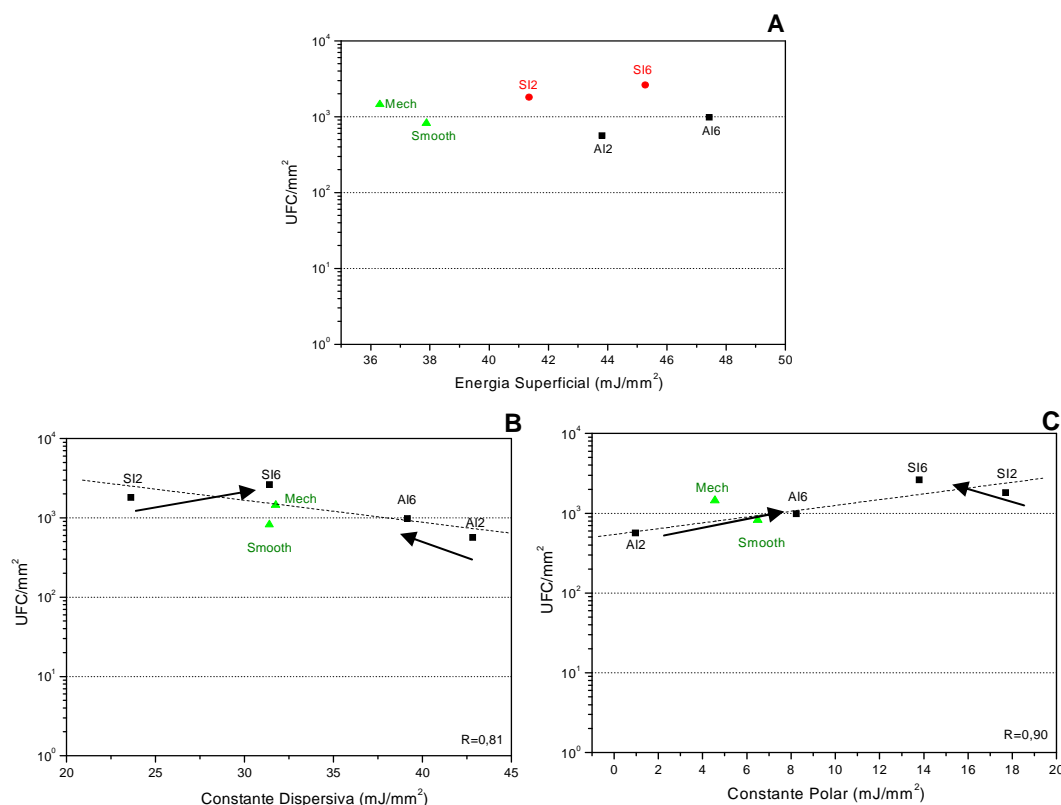
**Figura 3.12.** Cantidad de bacterias (*S. sanguinis*) adheridas sobre las diferentes superficies de titanio graficados contra la rugosidad. En A están representadas (en el eje y) el número total de bacterias cuantificadas sobre los discos de titanio, mientras que en B, esta representado el número de UFC/mm<sup>2</sup>.

Para *S. sanguinis*, los valores normalizados (UFC/mm<sup>2</sup>) se representaron en función de la energía superficial, la constante polar y constante dispersiva, los cuales se muestran en la figura 3.13. Los resultados muestran que al graficar estos valores vs la energía superficial total (Figura 3.13-A), la tendencia por tipo de partículas se asemeja a los resultados observados en la figura anterior, donde conforme aumentó la energía de superficie, el número UFC/mm<sup>2</sup> aumentó también, pero diferenciadas por el tipo de partícula, ya que en el caso de las muestras granalladas con carburo de silicio, el número de UFC/mm<sup>2</sup> fue un orden de magnitud mayor que en el caso de las muestras granalladas con alúmina. Al mismo tiempo, al representarlos contra la constante polar y dispersiva (separados por superficies granalladas y no granalladas), se pudo observar como el número de UFC/mm<sup>2</sup> disminuyó conforme aumento la constante dispersiva (Figura 3.13-B) y en el caso de la constante polar, el número de UFC/mm<sup>2</sup> aumentó proporcionalmente conforme este valor también aumento.

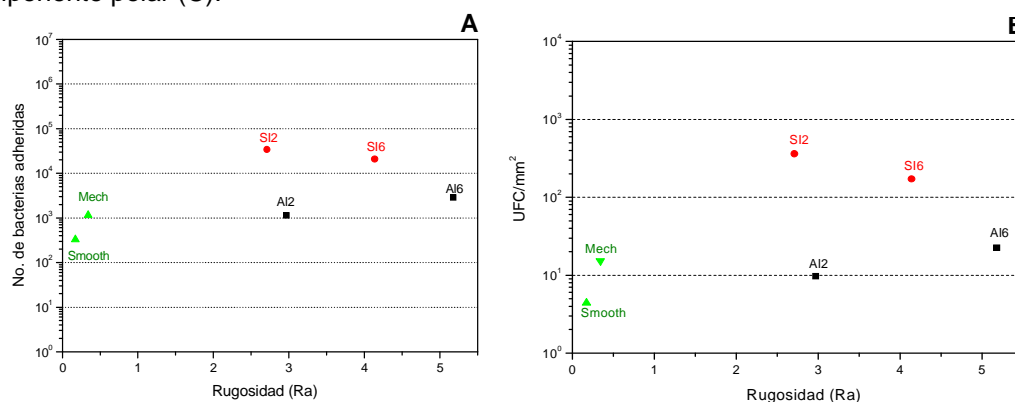
El comportamiento de *L. salivarius* en función de la Rugosidad esta representado en la figura 3.14, donde es posible observar la separación en el comportamiento de adhesión de esta bacteria sobre las superficies de titanio granalladas (A), siendo nuevamente las granalladas con carburo de silicio las que presentaron mayor número de bacterias adheridas comparadas con las superficies granalladas con alúmina. Este mismo comportamiento se observó cuando se



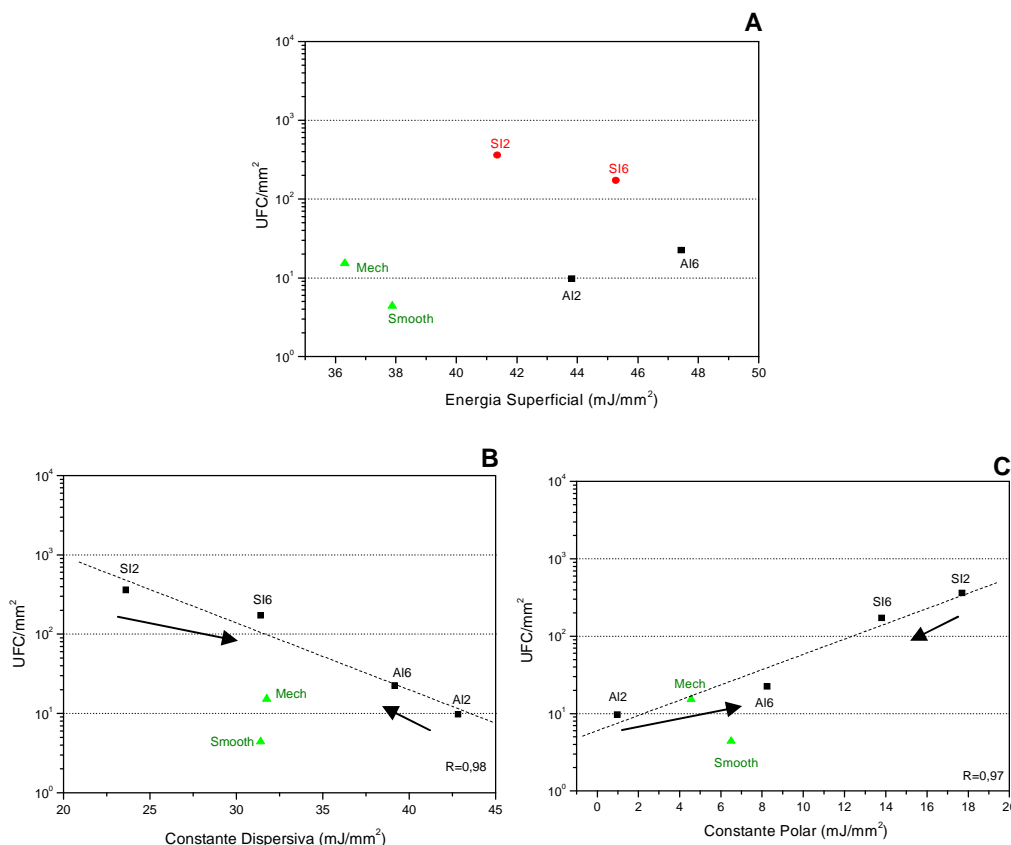
representaron estos valores de adhesión vs la energía superficial total (Figura 3.15-A), indicando de nuevo una separación entre tratamientos. Mientras que al ser graficados vs la constante dispersiva (Figura 3.15-B) y polar (Figura 3.15-C) se observó una separación entre las no granalladas y granalladas, donde estas últimas al ser graficadas vs constante dispersiva presentaron una marcada tendencia, ya que conforme el valor de esta constante aumentó, el número de UFC/mm<sup>2</sup>, disminuyó drásticamente y al mismo tiempo conforme el valor de la constante polar aumento, el número de bacterias por unidad de área aumento también.



**Figura 3.13.** Número de UFC/mm<sup>2</sup> (*S. sanguinis*) sobre las superficies de titanio, en este caso se representaron vs la energía superficial total (A), su componente dispersiva (B) y su componente polar (C).

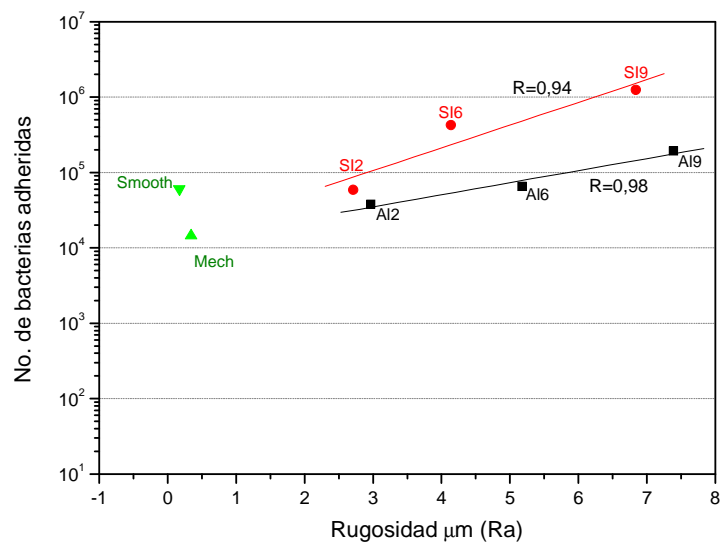


**Figura 3.14.** Cantidad de bacterias (*L. salivarius*) adheridas sobre las diferentes superficies de titanio graficados contra la rugosidad. En A están representadas (en el eje y) el número total de bacterias cuantificadas sobre los discos de titanio, mientras que en B, esta representado el número de UFC/mm<sup>2</sup>.



**Figura 3.15.** Número de UFC/mm<sup>2</sup> (*L. salivarius*) sobre las superficies de titanio, en este caso se representaron vs la energía superficial total (A), su componente dispersiva (B) y su componente polar (C).

Con todo lo anterior y con la finalidad de comprobar si el comportamiento de adhesión esta influenciado por el tipo de partícula empleada para el granallado se realizaron una nueva serie de ensayos de adhesión con *S. sanguinis* y una superficie con una rugosidad mayor de cada tipo, con la finalidad de ampliar la tendencia. En el caso de la superficie SI9 (granallada con carburo de silico) en valor de Ra obtenido fue de 6,93µm, mientras que la superficie AI9 (granallada con alúmina) este mismo valor fue de 7,3µm. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.16, en la cual se puede apreciar con mayor claridad, la separación entre los dos tipos de partículas empleadas en el proceso de granallado, las cuales mantienen la tendencia que se observó en la figura 3.12, evidenciando la influencia de la partícula en el comportamiento de adhesión de *S. sanguinis*.



**Figura 3.16.** Ampliación de la curva de No. de bacterias (*S. sanguinis*) vs rugosidad.



### 3.5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran el comportamiento de adhesión de *S. sanguinis* y *L. salivarius*, sobre las diferentes superficies de titanio. El tiempo de incubación de los medios inoculados por bacterias en contacto con las superficies de titanio, (y que denominamos como adhesión inicial bacteriana) fue de 2 horas. Este tiempo se seleccionó con el propósito de compararlo con el comportamiento de adhesión de fibroblastos sobre el mismo tipo de superficies.

El análisis de adhesión bacteriana se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Grivet y col [GSM99] y Mabboux y col [MPM04] quienes emplearon imágenes de microscopia óptica de inmunofluorescencia de las bacterias adheridas sobre las diferentes superficies de titanio con una tinción vital (naranja de acridina), que por un lado pudiera facilitar el uso de programas analizadores de imágenes (como ImageJ®) y que por otro lado indicará la viabilidad de las bacterias (ya que una célula teñida de color verde revela que esta viva en ese momento, mientras que un tono naranja indicara lo contrario). Sin embargo, problemas asociados a la rugosidad de las muestras dificultaron el análisis imposibilitando la cuantificación de las bacterias.

El principal de estos problemas fue la resolución vertical o profundidad de campo del microscopio, ya que al tener una superficie rugosa no es posible enfocar la totalidad de esta al mismo tiempo. Esto, dificulta enormemente la cuantificación, ya que en una superficie con una rugosidad mayor al tamaño de las células en observación (en este caso bacterias de entre  $0,5 > 1\mu\text{m}$ ), existe el problema de distinguir claramente si una bacteria ha sido cuantificada previamente a medida que se enfoca la superficie. Por otro lado, la rugosidad de las superficies favoreció la precipitación de la tinción, afectando la cuantificación del área cubierta por bacterias, ya que el analizador de imágenes no hacía distinciones entre bacterias y/o precipitados.

Por otro lado las imágenes de MEB, aunque proporcionan un mayor aumento y facilitan la diferenciación entre las unidades celulares, mostrando la forma de cada tipo de célula (esférica para *S. sanguinis* y su organización característica de collar de perlas o la forma de bastoncillos de *L. salivarius*) y que la resolución vertical del MEB permite observar al mismo tiempo el fondo de un valle y la cresta más alta de una superficie, presenta la limitación de requerir un mayor número de imágenes, para poder estimar el número de bacterias por área, además de la dificultad de distinguir

entre bacterias viables y no viables. En ambos métodos (MOE y MEB), la observación sólo es posible por un lado de la muestra, olvidando el anverso y los lados de los discos ensayados.

Por las razones expuestas en el párrafo anterior, se decidió que en este caso la cuantificación Unidades Formadoras de Colonias por unidad de área (UFC/mm<sup>2</sup>) a partir de las células viables desprendidas del total de la superficie (después de sus respectivos periodos de incubación) y sembradas en medio sólido, era la mejor opción para la cuantificación de bacterias sobre superficies de titanio; ya que por un lado, las bacterias que se cuantifican al final del ensayo son viables y capaces de proliferar y por otro lado las células que se han desprendido por Vortex han resistido varios lavados, siendo cuantificadas las bacterias más fuertemente adheridas. Los estudios realizados por Meinder y col. con algunos tipos de *Streptococcus* [MVB95] y Vadillo-Rodríguez y col. con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* [VBV05], han demostrado que en un muy breve periodo de tiempo la eliminación de estas bacterias de la superficie ensayada se dificulta más, ya que se encuentran en un estadio de adhesión denominado irreversible; es decir que las bacterias que se han anclado a la superficie necesitan métodos físicos y/o químicos para su eliminación (tales como un cepillado o el uso de un enjuague bucal) en lugar de un simple aclarado. [PFB07]

Los resultados de la cantidad de bacterias adheridas a las superficies de titanio por unidad de área, muestran la influencia del tratamiento superficial en el comportamiento de adhesión, ya que fue posible observar tres grandes grupos, los cuales se correspondían con el tipo de tratamientos de superficie, los no-tratados, Smooth y Mech (que presentaban una homogeneidad con respecto a la composición química); los granallados con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Al2 y Al6) y los granallados con SiC (Si2 y Si6). En el caso de *S. sanguinis*, se observó que los valores más bajos de adhesión los presentaron la superficie Smooth, y las granalladas con alúmina. Mientras que Si2 y Si6 presentaron los valores más altos de adhesión junto con la superficie Mech.

Cuando se representaron las UFC/mm<sup>2</sup> contra la rugosidad y la energía superficial, se pudo observar como el número de bacterias incrementó exponencialmente conforme aumentó la rugosidad, como lo demostraron anteriormente los estudios de Bollen y colaboradores [BLQ97] ó Pereira da Silva y colaboradores [PVU05] ó Hahnel y colaboradores [HRH09]. Sin embargo nuestros resultados mostraron que el tipo de partícula empleada en el proceso de granallado, juega un papel importante en este comportamiento ya que la curva de adhesión para

las muestras granalladas con alúmina estuvo siempre por debajo de la curva de adhesión para las muestras granalladas con carburo de silicio. En otras palabras para un mismo nivel de rugosidad la adhesión fue significativamente menor (en un orden de magnitud) para las muestras granalladas con alúmina. Más aún, al incorporar en la curva de número de bacterias adheridas contra rugosidad de dos superficies con mayor rugosidad (Al<sub>9</sub> y Si<sub>9</sub>, con la finalidad de aumentar el número de muestras por cada tipo de partícula) se observó que la tendencia antes descrita se mantuvo. Este comportamiento puede explicarse a partir de las propiedades de superficies de *S. sanguinis*, la cual demostró una afinidad muy alta por el cloroformo (solvente polar), lo que revela de la misma forma el comportamiento afín a las superficies granalladas con carburo de silicio, las cuales presentaron una constante polar mayor, en comparación con el resto de las superficies.

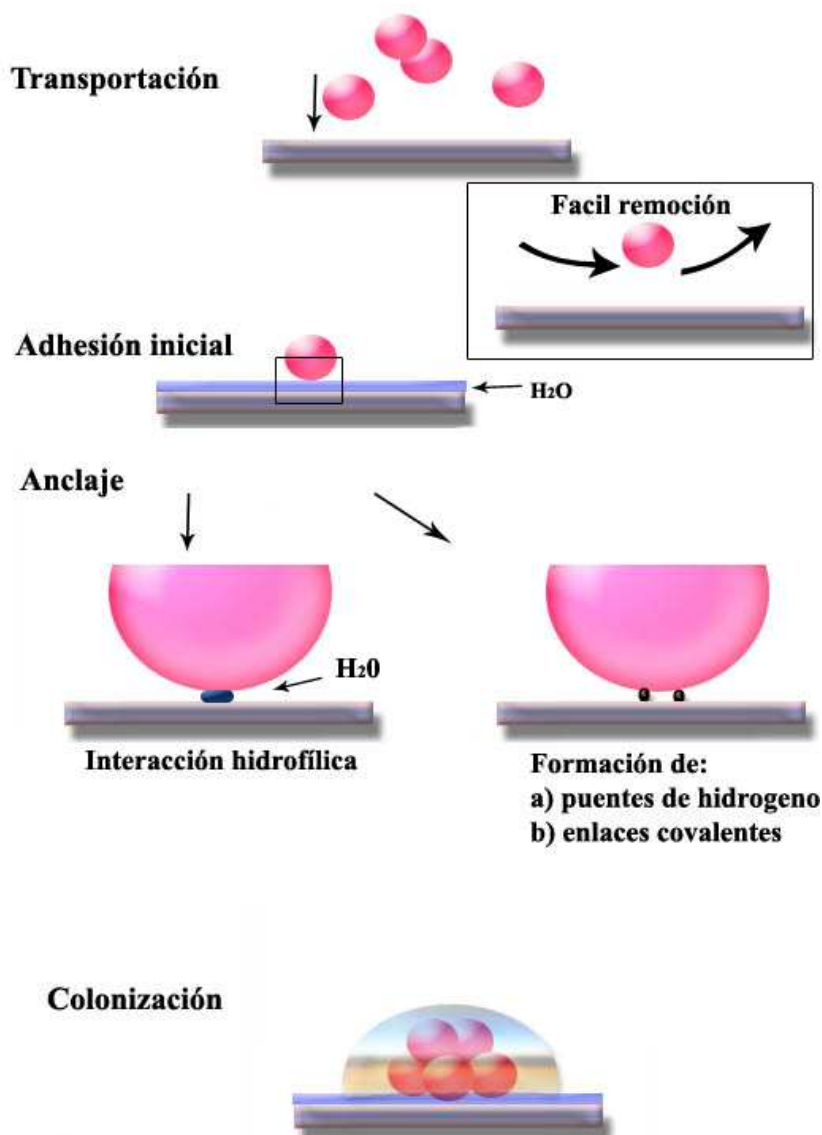
Pero el mecanismo de adhesión y anclaje de una bacteria a la superficie es más complejo. Una de las teorías aceptadas que existen sobre la adhesión de bacterias, se divide en dos partes. La primera se refiere el transporte y aproximación de la bacteria lo suficientemente cerca para permitir la adhesión inicial al lugar, através de fuerzas de van de Waals, fuerzas electrostáticas y/o interacciones hidrofóbicas [VLN87] [GEE91]. Nuestros resultados de MATS, en especial el referido a la afinidad por el hexano, nos indica la tendencia hidrofílica de ambas cepas, es decir que la interacción de la bacteria (o su pared celular) con la superficie se lleva a cabo inicialmente con la capa de agua adsorbida sobre la superficie del material.

Durante este contacto inicial las bacterias muestran aun movimientos Brownianos, como lo reportan Palmer y colaboradores [PFB07] y dicen que las bacterias pueden ser fácilmente removidos de la superficie en este estadio.

El siguiente paso crucial en este proceso, es la adhesión irreversible de las bacterias a la superficie como lo explica Dunne [DUN02], el mecanismo de anclaje de la bacteria a la superficie esta dado por la producción de exo-polisacaridos o ligandos específicos como los pili o fimbrias. Pasado este punto, la eliminación de las bacterias requiere de un procedimiento físico más fuerte (ya sea un cepillado o limpieza profesional) o incluso la utilización de productos químicos (como colutorios).

En la transición de una adhesión reversible a irreversible, existen otras fuerzas implicadas denominadas de rango corto como son: los enlaces covalentes, puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas. Estas últimas interacciones implican el

desplazamiento de la capa de agua entre la superficie de la bacteria y el material disminuyendo la distancia entre estas (Figura 3.17).



**Figura 3.17.** Esquematización de los pasos implicados en la colonización bacteriana.

Poortinga y colaboradores [PBB01] concluyen que las bacterias donadoras de electrones se adhieren más fuertemente a las superficies, ya que pueden llegar a formar una adhesión covalente con la superficie. Nuestros resultados mostraron la tendencia donadora de electrones de ambas cepas bacterianas (siendo mayor para *S. sanguinis*) observada por la afinidad al Dietil-eter, lo cual explicaría el porque esta bacteria es un colonizador primario (adhiriéndose fuertemente a las superficies tanto de los dientes como de los materiales implantados) facilitando la congregación de otras bacterias en la formación de placa dento-bacteriana y manteniendo la integridad

de dicha estructura, comparada con *L. salivarius* (la cual no es un colonizador primario, pero que ayuda al mantenimiento de la placa dento-bacteriana [FAS04]).

Finalmente, *L. salivarius* presentó un comportamiento muy similar de adhesión, ya que tanto las superficies no granalladas, como las granalladas con alúmina presentaron valores muy similares de adhesión por unidad de área, mientras que las superficies granalladas con carburo de silicio presentaron valores mucho mayores. Al mismo tiempo la pared celular de esta bacteria presentó una afinidad similar al cloroformo (solvente polar), lo que explica el número tan grande de bacterias sobre las superficies SI2 y SI6 comparadas con el resto de las superficies de titanio. Por otro lado, esta bacteria también presentó una tendencia hidrofílica y una tendencia donadora de electrones, pero menor comparada con *S. sanguinis*.

Los resultados más importantes de este capítulo son el comportamiento de adhesión de las bacterias sobre las diversas superficies de titanio cp, de las cuales de manera general podemos decir que los mejores resultados con respecto al menor número de bacterias por unidad de área, se obtuvieron con las muestras granalladas con  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , mostrando claramente la influencia de este tratamiento en dicho comportamiento.

### 3.6. CONCLUSIONES

Como conclusiones en este capítulo podemos decir que:

- La metodología empleada en este trabajo de Tesis, cuantificando las bacterias que previamente estuvieron adheridas a las superficies de titanio puede ser una técnica eficiente y confiable para dicho propósito, en especial cuando las superficies estudiadas son rugosas.
- El tipo de partícula empleada en el incremento de la rugosidad influye en el comportamiento de adhesión tanto de *S. sanguinis* (bacteria importante en la formación y desarrollo de la placa dento-bacteriana, ya que actúa como colonizador primario) como de *L. salivarius* sobre superficies de titanio, mostrando una diferencia entre las superficies granalladas con carburo de silicio y las granalladas con alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Estas últimas presentaron los menores valores de adhesión bacteriana (un orden de magnitud) comparadas con las otras superficies rugosas.
- El comportamiento de adhesión de ambas cepas, está influenciado por la constante polar de las superficies de titanio (ya que cuando éste valor aumentó la cantidad de bacterias aumento igualmente), la cual se vio incrementada por el uso de partículas de carburo de silicio en el proceso de granallado. Esta afinidad se evidenció igualmente en los resultados de MATS, en los cuales ambas cepas (*S. sanguinis* y *L. salivarius*) presentaron una gran afinidad a los líquidos polares (en este caso el cloroformo).
- Una superficie granallada con alúmina y con una Ra de  $\sim 3\text{ }\mu\text{m}$ , puede ser una buena opción, como tratamiento de superficie para implantes dentales, ya que por un lado estas superficies han presentado una buena respuesta celular tanto con osteoblastos (en trabajos previos dentro del grupo de trabajo de la UPC) como con fibroblastos y por otro lado presentaron una menor cantidad de bacterias adheridas por unidad de área comparadas con el resto de superficies.

### 3.7. REFERENCIAS

- [ABB06] Allion Audrey, Baron Jean-Philippe and Boulange-Petermann Laurence, Impact of surface energy and roughness on cell distribution and viability. *Biofouling*, 22(5) 2006: 269-278.
- [BBF05] Bantel Heike, Beikler Thomás, Flemmig Thomás F., Schulze-Osthoff Klaus. Caspase activation is involved in chronic periodontitis. *FEBS Letters* 579(2005) 5559-5564 (KEU05)
- [BLQ97] Bollen C., Lambrechts P., Quirynen M., Comparasion of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for nbacteria plaque retention: A review of the literature. *Dental Materials* 13 (1997) 258-269.
- [BOR05] Bornasi Elisa, Salgarello Stefano, Mensi Magda, Boninsegna Ramon, Stacchiotti Alexandra, Rezan Rita, Sapelli Pierluigi, Bianchi Rossella, Rodella Luigi F. *Histochemical and immunohistochemical evaluation of gingival collagen and metalloproteinases in peri-implantitis*. *Acta histochemica* 107 (2005) 231-240.
- [BRO96] Bellon-Fontaine M.-N., Rault J., van Oss C.J., *Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7 (1996) 47-53.
- [DUN02] Dunne M.W., Bacterial Adhesion-seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Review*, 15 (2002) 155-166.
- [FAS04] Filoche S., Anderson S., Sissons C., Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology Immunology* 19 (2004) 322-326.
- [FRS05] Frank Schwarz, Becker Jünger., *Treatment of periodontitis and peri-implantitis with an Er:YAG laser: Experimenatl and clinical studies*. *Medical Laser Applications* 20 (2005) 47-59.
- [FSL07] Fürst Mirjam m., Salvi Giovanni E., Lang P. Niklaus, Persson Rutger G., Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants, *Clinical Oral Implants Research* 18 (2007) 501-508.
- [GEE91] Gilbert P., Evans DJ, Evans E., Duguid IG, Brown MRW, Surface characteristics and adhesion of *E. coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(1991) 72-77.
- [GMS99] Grivet Mathieu, Morrier Jean-Jacques, Souchier Catherine, Barsotti Odile, Automatic enumeration of adherente streptococci or actinomyces on dental alloy by fluorescence images analysis. *Journal of Microbiological Methods* 38 (1999) 33-42.
- [GWM06] Gerber Jeanne, Wenaweser Doris, Heitz-Mayfield Lisa, Lang Niklaus P., Persson Rutger G. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. *Clinical Oral Implants Research*, 17 (2006) 1-7.
- [HGP72] van Houte J., Gibbons R. and Pulkkinen A., Ecology of human oral Lactobacilli. *Infection and immunity*. 6 (1972) 723-729.
- [HRH09] Hahnel S., Rosentritt M., Handel G., Bürgers R., Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion in vitro. *Article in press*. *Dental Materials* (2009), doi:[10.1016/j.dental.2009.02.003](https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.02.003)
- [KLY05] Leung W. Keung, Jin Lijian, Yau Joyce Y.Y., Sun Qiang, Corbet Esmonde F. *Microflora cultivable from minocycline strips placed in persisting periodontal pockets*. *Archives of Oral Biology* (2005) 50, 39-48.

- [KOL93] Kolenbrander Paul E. and London Jack, Adhere today, here tomorrow: Oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*, 175 (1993) 3247-3252.
- [MPM04] Mabboux Florence, Ponsonnet Laurence, Morrier Jean-Jacques, Jaffrezic Nicole, Barsotti Odile., *Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials-an in vitro study*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39(2004) 199-205
- [MSS05] Mayanagi G., Sato T, Shimauchi H., Takahashi N. *Microflora prolifing of subgingival and supragingival plaque of healthy and periodontitis subjects by nested PCR*. *International Congress Series* 1284 (2005) 195-196.
- [MVB95] Meinders J.M., Van de Mei H.C., Busscher J.H. Deposition efficiency and reversible of bacterial adhesion under flow. *Journal of Colloid Interface Science*, 176 (1995) 329-341.
- [PBB01] Poortinga A., Bos R., Busscher H.J., Charge transfer during staphylococcal adhesion to TiNOX® coatings with different specific resistivity. *Biophysical Chemistry* 91 (2001) 273-279.
- [PFB07] Palmer J., Flint S., Brooks J., *Bacterial cell attachmente, the beginning of a biofilm*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34 (2007) 577-588.
- [PSR09] Pham L., Sapnning R., Röling W., Prosperi A., Terefework Z., Cate J., Crielaard W., Zaura E. *Effects of probiotic Lactobacillus salivarius W24 on the compositional stability of oral microbial communities*. *Archives of Oral Biology* 54 (2009) 132-137.
- [PVU05] Pereira da Silva C., Vidigal G., de Uzeda M., Almeida G., Influence IF titanium surface roughness on attachment of *Streptococcus sanguinis*: an in vitro study. *Implant Dentistry* 14 (2005) 88-93.
- [RGH03] Alexander H. Rickard, Peter Gilbert, Nicola J.High, Paul E. Kolenbrander and Pauline S. Handley, *Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms*. *Trends in Microbiology* 11-2 (2003) 94-100
- [ROS00] Rosan Burton and Richard J. Lamont. Dental plaque formation. *Microbes and infection*, 2, 2000 1599-1607.
- [ROD00] Rudney J. Saliva and Dental Plaque, *Advances in Dental Research*, 14 (2000) 29-39.
- [SBN99] Sbordone Ludovico, Barone Antonio, Ciaglia Renato Nicodemo, Ramaglia Luca and Iacono Vicent J., Longitudinal study of dental implants in a periodontally compromised population. *Journal of Periodontology* 70 (199), 1322-1329.
- [SCH94] Scheie A., Mechanisms of dental plaque formation. *Advances in Dental Research*, 8 (1994) 246-253.
- [SIW96] Stainer R., Ingraham J., Wheelis M., Painter P. *Microbiologia*. Segunda Edición, Editorial Reverté, 1996, Pp 195-199.
- [SKE05] Sarkonen Nanna, Könönen Eija, Eerola Erkki, Könönen Mauno, Jousimies-Somer Hannele, Laine Pekka, Characterization of *Actinomyces* species isolated from failed dental implant fixtures. *Anaerobe* 11 (2005) 231-237.
- [SLO78] Slots J. and Gibbons R., Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subs. *Acaccherolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and od periodontal pockets. *Infection and Immunity* 19 (1978) 254-264.
- [TAN99] Tanner Anne C.R. and Taubman Martin A., Microbiota of Initial Periodontitis in Adults. *Anaerobe* 5 (1999) 229-235.



[VBV05] Vadillo-Rodríguez V., Busscher H.J., van der Mei H.C., de Vries J., Norde W. Role of Lactobacillus cell surface hydrophobicity strength. Colloids and Surface B. Biointerfaces 41 (2005) 33-41.

[VLN87] van Lossdrecht MCM., Lyklema J., Norde W., Schroa G., Zehnder AJB. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Applied Environmental Microbiology 53 (1987) 1893-1897.

[WAD05] Wade W.G., Munson M.A., Lillo A de, Weightman A.J. *Specificity of the oral microflora in dental caries, endodontic infections and periodontitis*. International Congress Series 1284 (2005) 150-157.

[WOO04] Wood Melanie R. and Vermilyea Stanley G., *A review of selected dental literature on evidence-based treatment planning for dental implants: Report of the Committee on research in fixed prosthodontics of the academy of fixed prosthodontics*. Journal of Prosthetic Dentistry 92 (2004) 447-462.

[WTR96] Winston J. Leslie, Toth Stephen I. Roe Bruce A., Dyer David W., Cloning and characterization of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gene encoding a heat-shock protein 90 homologue, Gene 179 (1996) 199-204.

[XAK07] Xu Ping, Alves Joao M., Kitten Todd, Brown Arunsri, Chen Zhenming, Ozaki Luiz S., Manque Patricio, Ge Xiuchun, Serrano Myrna G., Puiu Daniela, Hendrcks Stephanie, Wang Yingping, Chaplin Michael D., Akan Doruk, Paik Sehmi, Peterson Darrell L., Macrina Francis L. and Buck Gregory A., *Genome of the opportunistic Pathogen Streptococcus sanguinis*. Journal of Bacteriology 189 (2007) 3166-3175.

[ZIR07] Zilm P., Rogers A. *Co-adhesion and biofilm fromation by Fusobacterium nucleatum in response to growth pH*. Anaerobe 13 (2007) 146-152.

## Capítulo

### 4.

**Saliva artificial y bacterias  
presentes en la cavidad oral**  
(Ensayos in vitro de adhesión  
bacteriana, como una  
aproximación a las condiciones  
de la boca humana)

*“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”  
Albert Einstein (1879-1955)*

## 4.1. INTRODUCCIÓN

### 4.1.1. Aproximaciones a las condiciones de la cavidad oral humana.

Los ensayos *in vitro*, son una de las formas más simples de conocer la interacción de materiales (los cuales pretenden sustituir algún órgano o función perdida) con el medio interno. Una de las limitaciones para estos ensayos es el uso de medios específicos para un tipo celular ya que muchas de las veces son selectivos (favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras que suprime el de otros). Otra desventaja de estos medios es que no reproducen las condiciones normales del cuerpo humano en lo que se refiere a nutrientes, concentraciones de iones, presencia de proteínas, péptidos, restos celulares, etc.

La cavidad oral no es la excepción, ya que tenemos unas condiciones difíciles de reproducir. Por ejemplo la acumulación de detritos alimenticios en zonas retentivas (como en los surcos y fosetas de un molar, las troneras en las prótesis fijas e incluso en el surco periodontal), las variaciones de pH y de temperatura (incluso en la misma boca), así como la presencia de iones ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ), mucina, proteoglicanos, leucocitos, entre muchas otras cosas.

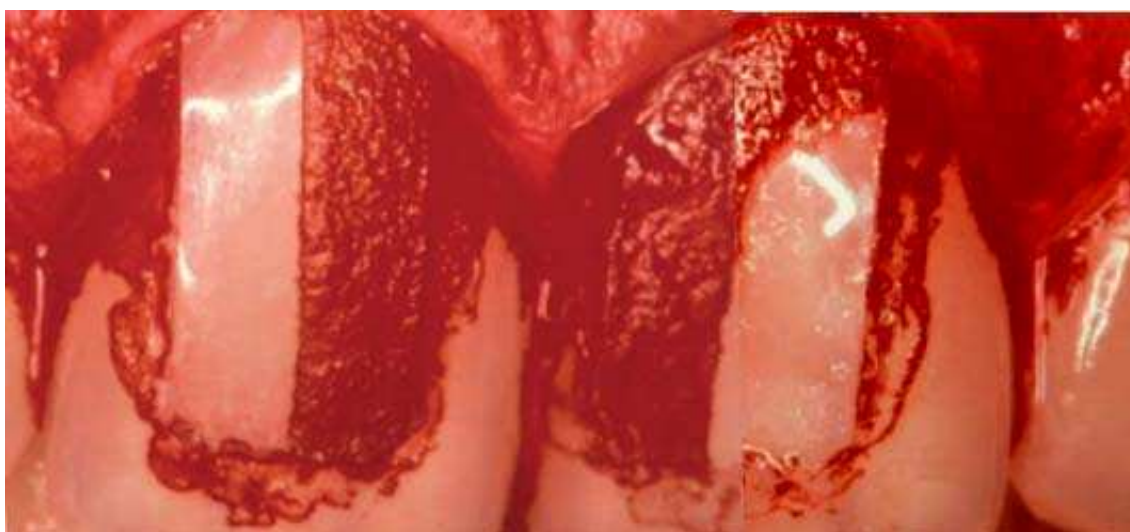
### 4.1.2. Placa dento-bacteriana.

En la cavidad orofaringea, existe un equilibrio dinámico entre la capacidad de adhesión de los microorganismos y una amplia variedad de fuerzas para su eliminación tales como: tragar, desprendimiento de las bacterias por fricción, ya sea debido a la dieta, a la acción de autolimpieza de la lengua (llamada autoclisis) y la acción limpiadora de la saliva y el fluido crevicular. Múltiples organismos patógenos pueden sobrevivir en la cavidad orofaringea cuando se encuentran firmemente adheridos a superficies retentivas.

La adhesión inicial a estas superficies retentivas, se da por una primera formación de un biofilm después de la formación de un film acondicionante. El proceso de adhesión puede ser considerado desde un punto de vista bioquímico o fisicoquímico. La aproximación bioquímica puntualiza las interacciones específicas entre componentes complementarios de la superficie (las interacciones específicas ligando-receptor). Dentro del mundo de las interacciones célula-célula, recientes

investigaciones sugieren que las flagelos, fimbrias y otros receptores de proteínas son esenciales para la adhesión de bacterias a las superficies.

Otros investigadores enfatizan los mecanismos fisicoquímicos no-específicos de la adhesión bacteriana, dentro de los cuales se encuentran o el modelo termodinámico (el cual se basa en las energías libres interfaciales de los líquidos y las superficies con las que interactúan) o la teoría DVLO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) en la cual la adhesión es considerada como el total de la suma de interacciones de Lifshitz, Van der Waals, ácido-base y las interacciones electrostáticas (también llamadas fuerzas de largo rango). [TVS06]



**Figura 4.1.** Fotografías mostrando el impacto clínico de la rugosidad y la energía superficial (SFE) sobre la formación de placa dento-bacteriana. En la cual dos pequeñas bandas fueron pegadas sobre los incisivos centrales superiores de un paciente que eliminó su higiene oral por tres días. Cada banda fue dividida en dos mitades: una región rugosa ( $R_a$  2  $\mu\text{m}$ ) localizada mesialmente y una región suave ( $R_a$  0.1  $\mu\text{m}$ ) localizada distalmente. La banda del lado derecho fue un acetato (con una SFE: 58  $\text{erg/cm}^2$ ) y la del lado izquierdo era Teflon (con una SFE: 20  $\text{erg/cm}^2$ ). Para observar la placa dento-bacteriana presente, se tiñó con una solución de rojo neutro al 0,5 %. La región más suave mostró una disminución en la formación del biofilm debido a una baja SFE, mientras que la región rugosa demostró el predominio de la rugosidad superficial, es decir más placa dento-bacteriana sin diferencias entre los dos materiales. [TVS06]

Los estudios experimentales *in vivo* de la placa dento-bacteriana tanto en humanos como en animales son altamente restrictivos. Múltiples complicaciones y problemas éticos, incluyendo la inducción de gingivitis por la simple acumulación de placa dento-bacteriana, además de dificultades con el acceso y la toma de muestras son algunas de los problemas que presentan este tipo de ensayos. La mayoría de ensayos de este tipo se realizan colocando (ya sea por sistemas adhesivos o adheridos a aditamentos removibles) bandas con diversos tipos de rugosidad, para evaluar la formación de placa dento-bacteriana en un determinado periodo de tiempo

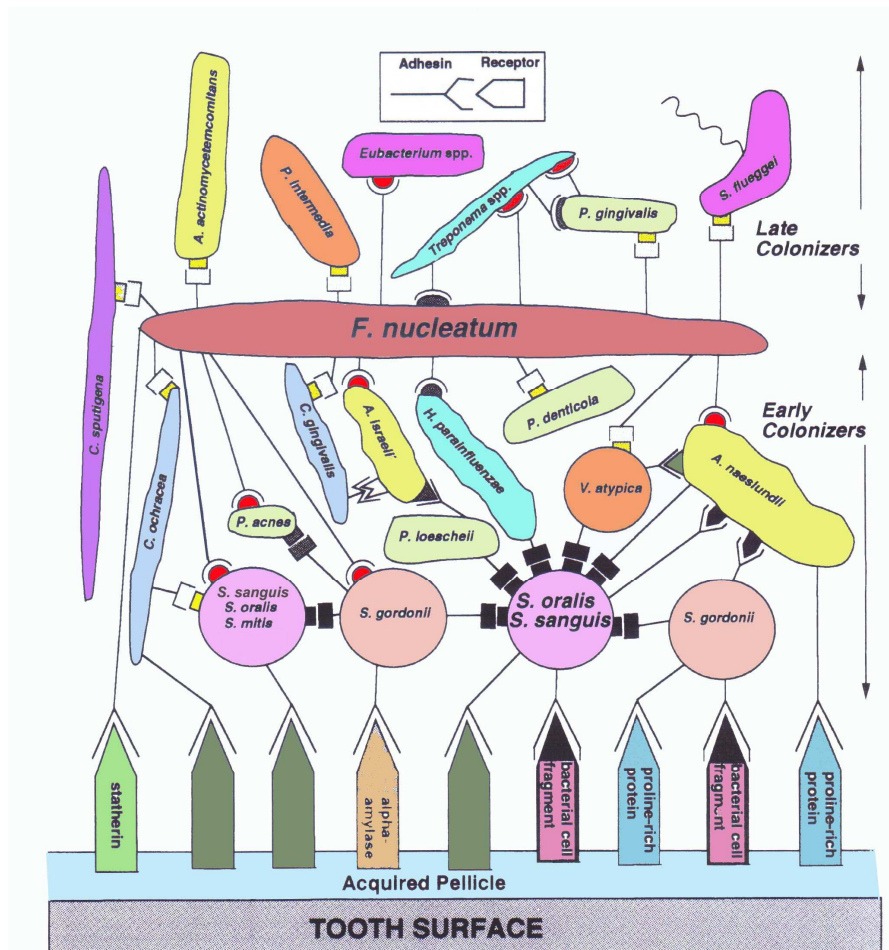
(durante el cual el voluntario ha de eliminar sus hábitos de limpieza bucal) como se observa en la Figura 4.1. Este tipo de estudios enfatizan el impacto clínico de la rugosidad superficial, por ejemplo Quirynen y colaboradores en un seguimiento clínico durante 3 meses en un estudio paralelo donde reportaron una rápida formación de placa supragingival sobre pilares de titanio comparado con la superficie dental y subgingivalmente encontraron que superficies rugosas alojaban 25 veces más bacterias, con una densidad ligeramente menor de cocos. [QUI93]

Otros estudios como el de Bollen y col [BPV96] [BLQ97] o el de Quirynen y col. [QBP96] concluyen que una Ra con valor de 0.2  $\mu\text{m}$  es el límite de rugosidad, en el cual la adhesión bacteriana no puede reducirse.

La placa dento-bacteriana es un biofilm microbiano definido sólo por su localización sobre la superficie del diente, pero este biofilm presenta grandes diferencias en cuanto a cepas y organización dependiendo de la zona de ubicación, es decir: la placa en fisuras, en la superficie proximal, pero principalmente ha sido definida como sub o supragingival. El entendimiento del papel de esta gran biodiversidad es necesario si se pretende predecir y controlar la aparición de especies y clonotipos, los cuales tienen un mayor impacto sobre el comportamiento de la placa y sobre las patologías buco-dentales.

El comportamiento y desarrollo de la placa-dento-bacteriana, presenta una complejidad en la flora microbiana que lo forma (más de 500 especies juntas), con la presencia de una película (Figura 4.2), una variedad dinámica en la disponibilidad de nutrientes temperatura y humedad, además de una gran variedad de fuerzas de interacción, hace que resulte difícil una simple explicación de los procesos. Además, recientes investigaciones han demostrado que la organización de la placa dento-bacteriana, no es una estructura compacta. Marsh y colaboradores, confirmaron por Microscopia Confocal que ésta presenta una arquitectura abierta con canales y vacíos. Dentro del biofilm, las bacterias orales no existen como entidades independientes, si no que funcionan como una comunidad coordinada, espacialmente organizada y metabólicamente totalmente integrada. El estilo de vida de esta comunidad dentro de la placa dento-bacteriana provee unos enormes beneficios, potenciales para los organismos participantes, que incluyen: un amplio rango habitacional para el crecimiento (el metabolismo de los colonizadores primarios altera el ambiente local, proporcionando las condiciones más apropiadas para la adhesión y el crecimiento posterior de las especies más agresivas), un incremento en la diversidad metabólica y

eficiencia (moléculas que normalmente son difíciles de catabolizar por organismos individuales, pueden ser desintegradas por el conjunto microbiano) y un aumento de la resistencia al estrés ambiental, a los agentes antimicrobianos y a las defensas del huésped (Figura 1). [TVS06]



**Figura 4.2.** Representación esquemática de la agregación bacteriana en la placa dental, donde los colonizadores primarios se adhieren a la película adquirida, ya sea por algún receptor específico, o por adhesión inespecífica, facilitando la adhesión de los colonizadores secundarios, entre los cuales se encuentran *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. [KOL93]

#### 4.1.2.1. Formación de la película adquirida

Cuando los microorganismos y el sustrato están en un ambiente acuoso en el cual un material orgánico está presente (ya sea, agua, leche, fluido lagrimal, orina, sangre o saliva), estos logran cubrir inmediatamente la superficie a través una capa adsorbida de moléculas orgánicas. Esto se llama comúnmente capa acondicionadora, simplemente por que el transporte y adsorción de moléculas a un sustrato ocurren relativamente rápido, comparados con la velocidad de los microorganismos. Esta capa consiste en numerosos componentes incluidos glicoproteínas (mucinas) proteínas

ricas en prolina, fosfoproteínas (estaterina), proteínas ricas en histidina, enzimas (como la  $\alpha$ -amilasa) que pueden funcionar como sitios de adhesión para las bacterias (mediadas por receptores). La adhesión bacteriana ocurre entonces por medio de dos películas adquiridas, una sobre la bacteria y otra sobre la superficie. Los mecanismos que se encuentran involucrados en la formación de ésta película son fuerzas de van der Waals y fuerzas hidrofóbicas. [SWS97]

#### **4.1.2.2. Ensayos in vitro de la placa dento-bacteriana.**

Como es evidente, es difícil realizar estudios *in vivo* del comportamiento de la placa dento-bacteriana, por lo que los ensayos *in vitro* han sido objeto de amplios estudios. Dos aproximaciones microbiológicas complementarias han sido realizadas para generar y estudiar las propiedades de esta biodiversidad. La primera fue la construcción de un conjunto sintético similar a la placa dento-bacteriana con la mayor cantidad de especies pertenecientes a esta. Y la segunda aproximación, siguiendo la evolución de este complejo microbiológico en un microambiente (ambiente artificial pareciado a la cavidad oral) a partir de la microflora bucal natural. [SIS97]

Sissons C.H., ha realizado un arduo trabajo en la comprensión del proceso de formación de biofilms [SWS97] [SWS98] [SIS97] [WON01] [WON07]. Debido a que la placa dento-bacteriana presenta una biodiversidad, heterogenicidad y una organización estructural cambiante con respecto al tiempo pero a su vez, mantiene una homeostasis considerable, por lo que existen múltiples dificultades técnicas para la recreación de este biofilm. Esto sin tener en cuenta la alta heterogenicidad o biodiversidad de entre 30 a 300 especies en 500 grupos taxonómicos, además del número desconocido de subespecies genéticamente distintos de cada cepa. Además esta microflora varía ampliamente entre las zonas intraorales, entre individuos y con respecto al tiempo. Estas dificultades han llevado a Sissons al desarrollo de un medio llamado BMM, como un medio nutricional análogo a la saliva, en el cual logra el desarrollo de la placa dento-bacteriana *in vitro*.

Aunque sus resultados de formación de biofilms sobre superficies dentales, son realmente muy cercanos a la realidad, es difícil el estudiar la interacción de manera individual de una cepa presente en la placa dento-bacteriana.

#### **4.1.2.2.1. Ensayos de adhesión bacteriana in vitro.**

Varios estudios han sido realizados para cuantificar la cantidad de bacterias adheridas a superficies de implantes, materiales de restauración e incluso dientes naturales, con la finalidad de entender dicho comportamiento y así buscar las características de superficie que disminuyan o eliminen la colonización de bacterias y la formación de placa dento-bacteriana.

Investigadores como Grössner-Schreiber [GGH01], Gerber [GWM06], Fürst [FSL07], Mabboux [MPM04], Länge [LHS04], Steinberg [SSK98] y Hauser-Gerspach [HKW07] han intentado aproximar las condiciones de boca en ensayos de adhesión de bacterias sobre diversas superficies cubriendo las muestras con saliva obtenida de un voluntario, después de estimular la salivación con un polímero elástico (parafilm) o algodón y posteriormente filtrado (filtro de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$ ) y/o centrifugado para eliminar bacterias, restos de alimentos, proteínas y células.

Estos ensayos son de baja reproducibilidad, ya que no hay una evaluación ni control de la concentración de nutrientes, iones, proteínas, glicoproteínas, enzimas, células, pH, viscosidad, etc. en la saliva natural, que además puede variar entre individuos e incluso habra variaciones en una misma persona dependiendo del día e incluso la hora de recolección [SVA95] [STO07]. Además, las bacterias que previamente habían sido inoculadas en medios rutinarios de cultivo no tendrán el tiempo necesario para adaptarse al nuevo ambiente (denominado periodo de adaptación o lag).

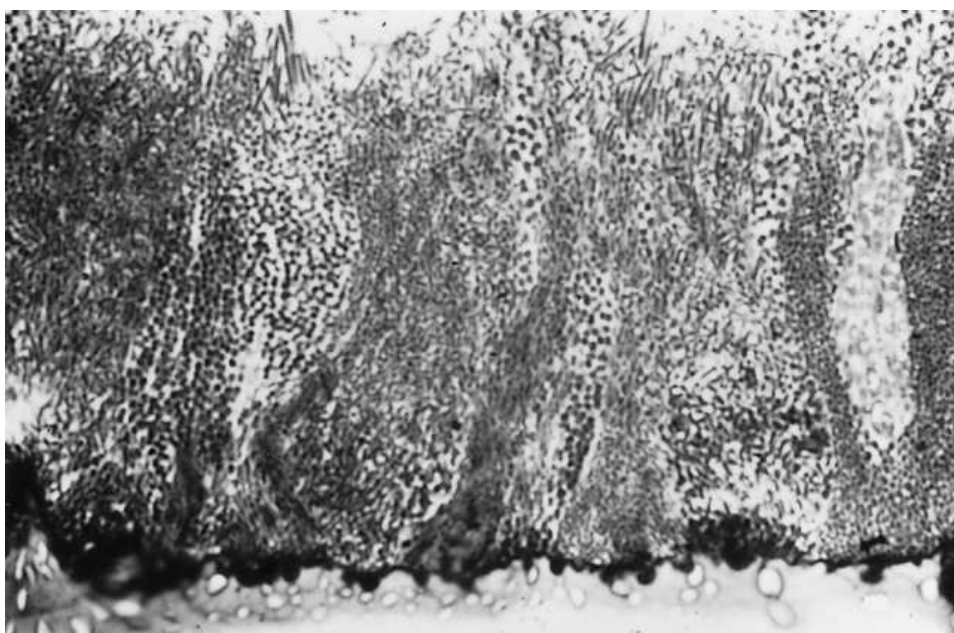
Buscar un sustituto de la saliva natural para el crecimiento de las bacterias que juegan un papel fundamental en la colonización de superficies (colonizadores primarios) presentes en la cavidad oral y su comportamiento en el proceso de adhesión, facilitaría los estudios sobre materiales implantables en la cavidad oral.

#### **4.1.2.3. Saliva artificial.**

La saliva humana es un fluido complejo que consiste en agua, glicoproteínas (como la mucina), enzimas (lipasas y amilasas), sustancias antimicrobianas tales como las lactoferrinas, cistinas, histatina, tiocinato, iones ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , etc.) inmunoglobulinas y lípidos (netos y polares) y que le confieren propiedades reológicas e interfaciales específicas. Desde el punto de vista biofísico, la



saliva es un fluido viscoelástico con diversas actividades superficiales en la cavidad oral, tales como lubricación durante la masticación (manteniendo la integridad de la mucosa oral), efecto tampon por los cambios de pH e incluso la remineralización del esmalte dental [PRE05]. La cantidad que un individuo secreta es alrededor de 1,5 litros por día, y aunque es relativamente fácil obtenerla, la concentración de sus componentes no es constante, además de presentar bacterias y algunos hongos (*Candida albicans*), por lo que el uso de una saliva artificial para ensayos es más viable.



**Figura 4.3.** Placa dento-bacteriana teñida sobre una lamina de resina Epon® adaptada al contorno de un diente y colocada en boca por dos días. La banda negra (en la parte inferior de la imagen) corresponde a la película adquirida. [LMT75]

El uso de la saliva artificial tiene múltiples aplicaciones, tanto en el área médica como en el campo de la ingeniería. En este último se han utilizado principalmente para la realización de ensayos de corrosión y de liberación de partículas tanto de metales y sus aleaciones como de materiales de restauración (ionómeros de vidrio, resinas, cementos de fosfatos, etc.) que se colocarán en la cavidad oral [MAL90] [ETH93] [HHH03] [JLH89], donde el principal componente a evaluación es la concentración de iones disueltos y el efecto que pueden tener en la superficie del material.

En el área médica, se emplea como un auxiliar en el tratamiento de la Xerostomía, (padecimiento que puede asociarse a cáncer o al Síndrome de Sjögren o como secuela de quimio ó radioterapia), el cual se caracteriza por una disfunción de las glándulas salivales, las cuales resultan en cambios en calidad y cantidad de la saliva.

Esto puede resultar en síntomas de resequead bucal, o escoriaciones en la mucosa, dificultades para hablar, problemas con la digestión, sialoadenitis (presencia de cálculos en los conductos salivales), aumento en la presencia de caries y enfermedades periodontales [STO07].

En la literatura existen diversas composiciones, buscando siempre la similitud en concentración de iones y pH de la boca (7-7.4). La variedad de esta es muy amplia, pero los componentes más comunes son:

- Dihidrogeno-ortofosfato de potasio
- Cloruro de potasio
- Cloruro de Sodio
- Cloruro de Magnesio
- Cloruro de Calcio
- Bifosfato de potasio
- Carboximetilcelulosa de sodio
- Fluoruro de sodio
- Sorbitol
- Metil p-hidroxibenzoato.

De acuerdo con Preetha y Banerjee [PRE05], estos componentes permiten obtener una saliva artificial con una tensión superficial cercana a la real. Aunque la viscosidad y la viscoelasticidad de la saliva natural son diferentes, esta saliva presenta un pH y una concentración iónica más aproximada al de la saliva natural. Y por otro lado permite hacerle modificaciones (como el agregar mucina, azúcares o lípidos), lo que la convierte en un medio reproducible (comparada con la saliva natural extraída de pacientes) para cualquier tipo de ensayos.

## 4.2. OBJETIVOS

Tomando como referencia, la composición base de la saliva artificial, empleada tanto para pacientes con Xerostomía, como en los ensayos de corrosión y liberación de partículas los objetivos de este capítulo son:

- Adicionar los suplementos necesarios para promover el crecimiento de *S. sanguinis* y *L.salivarius* en saliva artificial.
- Realizar estudios de adhesión bacteriana sobre discos de Titanio comercialmente puro, con las bacterias inoculadas en la saliva artificial.
- Cuantificar el número de bacterias adheridas en la superficie por unidad de área.
- Analizar la influencia de la saliva artificial en el comportamiento de las bacterias sobre las superficies de titanio.

### 4.3. MATERIALES Y METODOS

#### 4.3.1. Superficies de titanio y bacterias para ensayos de adhesión

Tomando como referencia los ensayos del capítulo anterior, se optó por trabajar sólo con las tres superficies más representativas de cada caso, es decir, Smooth (por ser la superficie lisa de referencia), Al2 (por presentar los valores de adhesión bacteriana por unidad de área más bajos) y SI2 (por tener valores de rugosidad y mojabilidad similares a Al2). Las muestras empleadas para estos experimentos presentaban las mismas dimensiones, es decir 5mm de diámetro y 2mm de espesor. Para estos ensayos se emplearon dos mismas cepas bacterianas que en el capítulo 4 (*S.sanguinis* y *L. salivarius*).

#### 4.3.2. Saliva artificial

Tomando en cuenta la composición base de la saliva artificial (con una viscosidad de  $63,5 \pm 3$  mPa/s a  $36,5$  °C), se obtuvo una saliva a la cual se le agregaron tres componentes para obtener una Saliva Artificial Modificada (MSAM) (Tabla 4.1), para favorecer e incrementar el crecimiento de las bacterias (ya que esta saliva no promovió por sí sola el crecimiento de ambas cepas), la cual presentó una viscosidad de  $23,7 \pm 2$  mPa/s.

**Tabla 4.1.** Composición del MSAM, las cantidades están expresada en g/L, los componentes marcados con (\*) fueron agregados para favorecer el crecimiento de las bacterias.

| Composición de la Saliva Artificial Modificada |      |
|--|------|
| Cloruro de potasio                             | 1,2  |
| Cloruro de Sodio                               | 0,84 |
| Cloruro de Magnesio                            | 0,05 |
| Cloruro de Calcio                              | 0,15 |
| Bifosfato de Potasio                           | 0,34 |
| Sorbitol 70%                                   | 30   |
| Carboximetilcelulosa sódica                    | 10   |
| <b>Extracto de levadura*</b>                   | 1    |
| <b>Casaminoácidos *</b>                        | 1    |
| <b>Glucosa *</b>                               | 10   |

#### 4.3.3. Ciclo de crecimiento de poblaciones.

Previo inoculación de las bacterias en medio líquido (MRS broth para *L. salivarius* y Todd-Hewitt broth para *S. sanguinis*), ambas cepas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$

con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, posteriormente se hizo un inóculo 1-10 en la saliva artificial modificada (MSAM) y se incubó a 37°C. El seguimiento de células viables y su crecimiento se llevo a cabo midiendo la turbidez del medio a 600 nm, y la cuantificación de viables se hizo cuantificando el número de colonias formadas, después de sembrar en medio sólido una alícuota del inóculo original.

#### 4.3.4. Adhesión de bacterias en MSAM sobre superficies de titanio.

Los discos de Ti-cp se colocaron de manera individual en tubos Eppendorf® de 1,5 ml de capacidad, con un 1ml de medio con bacterias (Todd-Hewitt broth para *S. sanguinis* y MRS broth para *L. salivarius*) a una concentración aproximada de  $5 \times 10^7$  ufc/ml (4 discos por cada ensayo) y se incubaron a 37°C durante 2 horas.

#### 4.3.5. Observación de las bacterias por MEB

Para su observación por MEB después del periodo de incubación, las muestras se lavaron cuidadosamente con PBS 1X (dos veces para eliminar las bacterias que no estaban bien adheridas a la superficie y las que habían muerto), se agregó glutaraldehído al 2,5 % por espacio de 30 minutos para fijarlas. Pado el tiempo de fijación se lavaron con tampón de fosfatos 0,1M 2 veces y se les colocó Tetraóxido de Osmio (OsO<sub>4</sub>) por espacio de 1,5 horas, se lavarón suavemente con agua Milli Q 3 veces y se deshidrato (Tabla 4.2). Finalmente se depositó una delgada capa de oro sobre la superficie para facilitar su interacción con el haz de electrones.

**Tabla 4.2.** Tiempos de deshidratación, para la posterior observación de las muestras por MEB.

| Alcohol<br>(concentración)<br>% | Tiempo de<br>deshidratación<br>(minutos) | Cambios<br>de Medio |
|---------------------------------|--|---------------------|
| 50                              | 10                                       | 1                   |
| 70                              | 10                                       | 1                   |
| 90                              | 10                                       | 1                   |
| 96                              | 10                                       | 3                   |
| 100                             | 15                                       | 1                   |
| 100                             | 20                                       | 1                   |
| 100                             | 30                                       | 1                   |

#### 4.3.6. Cuantificación de bacterias sobre las superficies de titanio.

La cuantificación se realizo de la misma manera que en el capítulo 3. Para cuantificar el número de bacterias por unidad de área, fue necesario el separar las

bacterias de las superficies de titanio, sembrar en medio sólido (agar) y contabilizar el número de colonias formadas, considerando que cada célula es capaz de formar una colonia sobre la superficie.

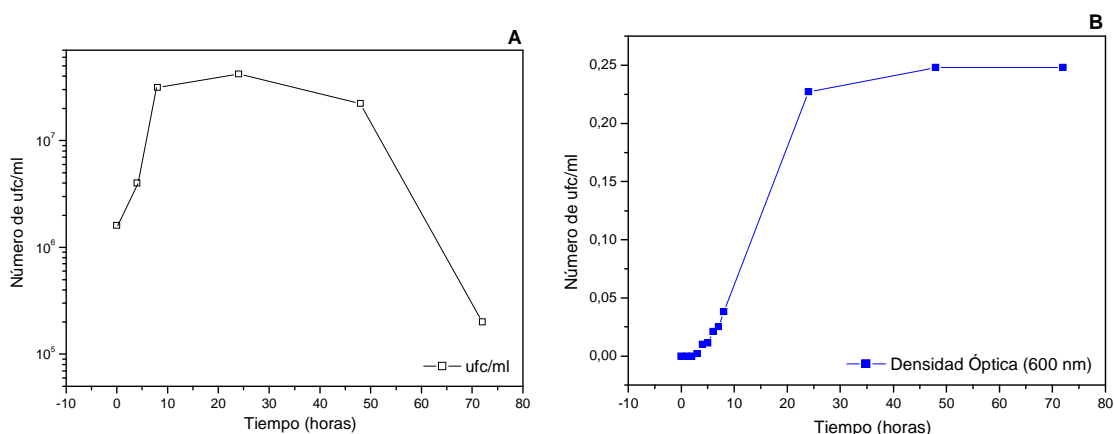
## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. Crecimiento de poblaciones en saliva artificial.

Previamente se hicieron ensayos de crecimiento de *S. sanguinis* (CECT 480) y *L. salivarius* (CECT 4063) en la saliva artificial (sin modificaciones), pero no hubo crecimiento en ambos inóculos, por lo que se modificó esta saliva, agregando carbohidratos y aminoácidos necesarios para el mantenimiento de ambas cepas (Tabla 4.1).

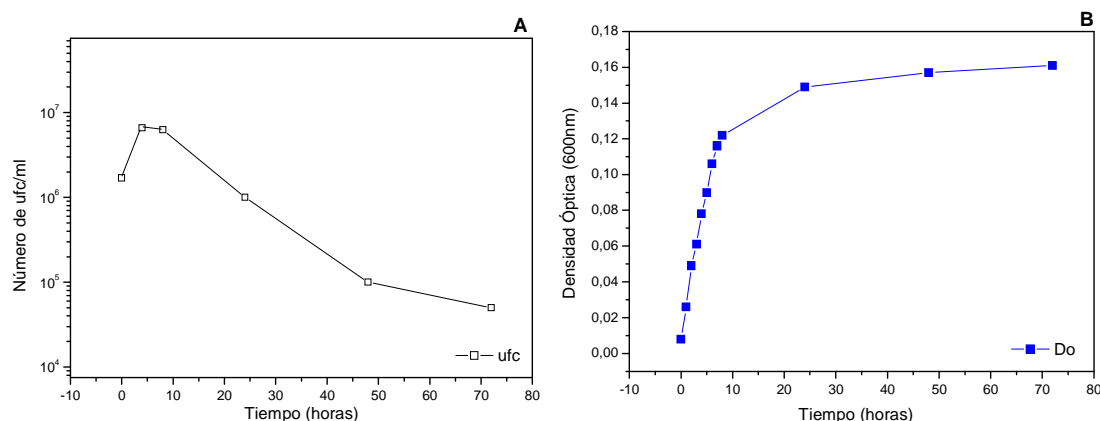
### 4.4.2. Crecimiento de poblaciones en Medio Saliva Artificial Modificada (MSAM).

Los resultados de los ensayos de crecimiento con esta Saliva Artificial Modificada fueron evaluados con ambas cepas hasta las 72 horas. (Figuras 4.4 y 4.5). En el caso de *S. sanguinis* fue posible observar un crecimiento significativo en MSAM, durante las primeras 24 horas, y a partir de este punto, se observa como empieza a decrecer lentamente el número de células viables en el medio hasta las 48 horas y a partir de ese punto, este número decrece rápidamente. Este comportamiento es el mismo observado en Todd-Hewitt broth.



**Figura 4.4.** Crecimiento de *S. sanguinis* en MSAM, donde se muestran el número de viables (A) y la densidad óptica (B) del medio (medida a 600 nm).

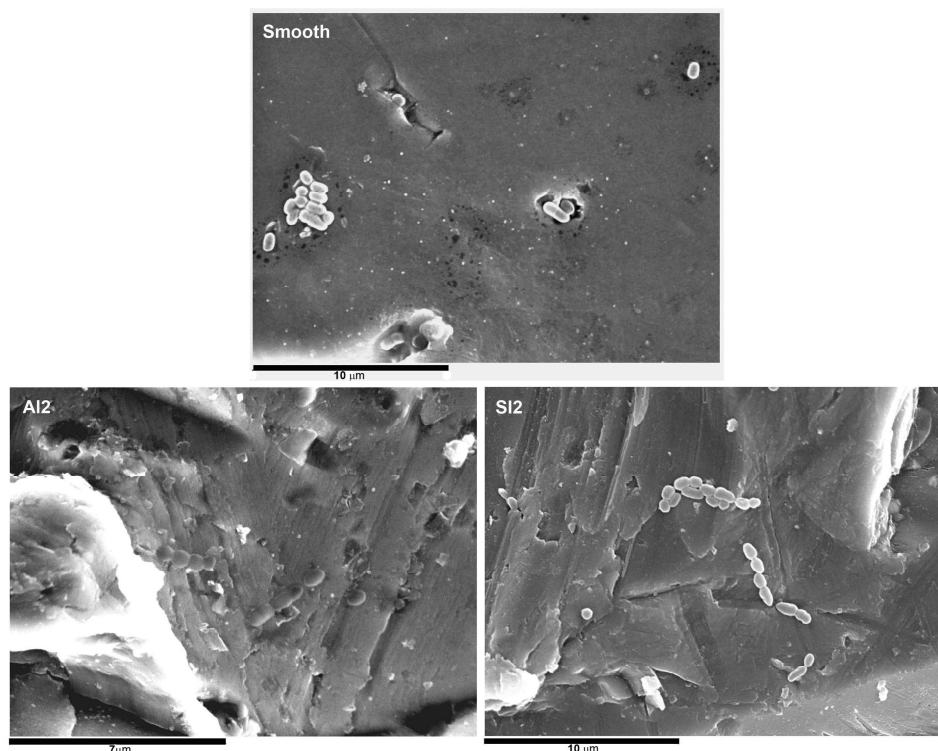
En el caso de *L. salivarius*, pudimos observar que el medio modificado no favoreció su crecimiento, ya que aunque se observó un aumento de la turbidez del medio (Figura 4.5-B) la viabilidad de dicha cepa no fue la esperada, ya que *L. salivarius* en MSAM tuvo su máximo valor de ufc/ml a las 4 horas, disminuyendo rápidamente a lo largo de todo el ensayo, como lo muestra la Figura 4.5.



**Figura 4.5.** Crecimiento de *L. salivarius* en MSAM. Se muestran el número de viables (A) en el medio y la densidad óptica en B (medida a 600 nm).

#### 4.4.3. Observación de las bacterias por MEB.

Una vez comprobado, la viabilidad de *S.sanguinis* y *L.salivarius* se prosiguió con el mismo protocolo de observación por MEB de la presencia de bacterias sobre las diversas muestras de titanio, para comprobar que se habían adherido a las superficies. Es importante decir en este punto, que aunque *L. salivarius* no mostró un crecimiento marcado en MSAM, se decidió realizar el ensayo de adhesión inicial, ya que de acuerdo con los resultados mostrados en el capítulo anterior el número de UFC's/mm<sup>2</sup>, se encontraba dentro del número mínimo de células viables en el medio.

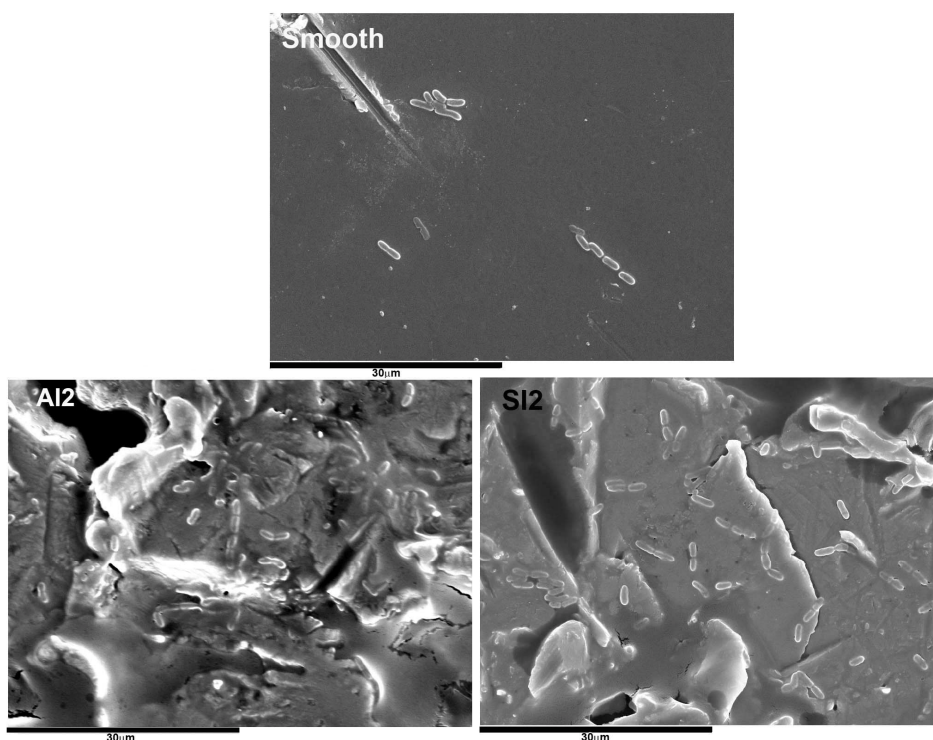


**Figura 4.6.** Imágenes de MEB de *S. sanguinis* (CECT 480) inoculada en MSAM, después de 2 horas de incubación a 37°C sobre las muestras de ti-cp.



Las primeras observaciones tanto de *S. sanguinis* (Figura 4.6) como de *L. salivarius* (Figura 4.7), sobre las 3 superficies seleccionadas de titanio, muestran que en los dos casos, ambas cepas estaban presentes en dichas superficies. En el caso de *S. sanguinis*, pudo observarse la formación de pequeñas colonias en todos los casos. En el caso de *L. salivarius* se observó una mayor cantidad de bacterias sobre todas las superficies.

Como en el capítulo anterior, las imágenes de MEB no mostraban diferencias importantes entre la cantidad de bacterias por unidad de área sobre las diversas superficies. Tampoco fue posible diferenciar entre bacterias viables y las que no lo eran, por lo que se realizó el procedimiento descrito en el capítulo anterior para la cuantificación de bacterias por unidad de área.

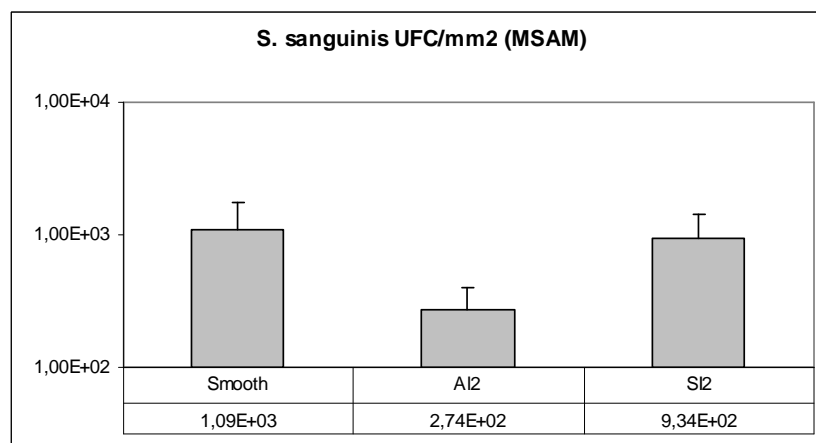


**Figura 4.7.** Imágenes de MEB de *L. salivarius* (CECT 4063) inoculada en MSAM, después de 2 horas de incubación a 37°C sobre las muestras de ti-cp.

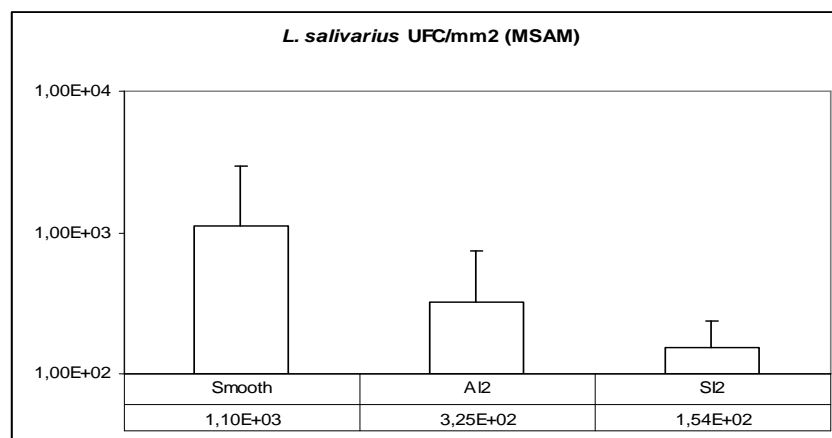
#### 4.4.4. Cuantificación de bacterias viables sobre las superficies de titanio.

Los resultados obtenidos en cuanto a la cuantificación de bacterias por unidad de área en el caso de *S. sanguinis* mostraron la misma tendencia que en el capítulo anterior, ya que en ambos casos tanto en medio Todd-Hewitt como en MSAM, la muestra AI2 presentó el menor número de bacterias por unidad de área (CFU's/mm<sup>2</sup>) comparada con SI2 e incluso menor que la muestra Smooth como se muestra en la

Figura 4.8. En este caso, tanto la muestra Smooth como la SI2 mostraron valores muy similares de bacterias por unidad de área. Por otro lado, las muestras incubadas con *L. salivarius*, mostraron una tendencia totalmente diferente, ya que aunque la muestra AI2 presento un menor número de bacterias en comparación con la muestra Smooth, la muestra SI2 fue la que presentó la menor cantidad de CFU's/mm<sup>2</sup>, disminuyendo incluso hasta en un orden de magnitud (Figura 4.9) comparada con la muestra Smooth.



**Figura 4.8.** Cuantificación de bacterias (*S. sanguinis*) por unidad de área inoculada en MSAM. Los resultados muestran un menor número de bacterias por unidad de área adheridas sobre la AI2.

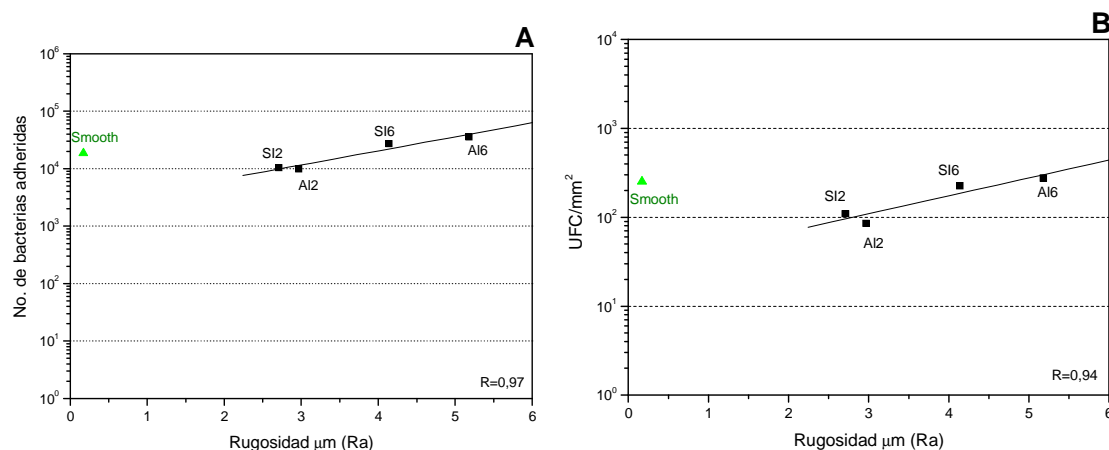


**Figura 4.9.** Cuantificación de bacterias (*L. salivarius*) por unidad de área, previamente inoculada en MSAM. Donde se aprecia un menor número de bacterias por unidad de área tanto en AI2 como en SI2, comparadas con Smooth.

Con estas únicas tres superficies no fue posible el determinar un comportamiento de partícula, como en el capítulo anterior, por lo que se decidió ampliar el número y tipo de muestras granalladas. Por otro lado esta ampliación de datos solo se realizó con *S. sanguinis*, por se la bacteria implicada directamente en la formación de la placa dento-bacteriana. Los resultados obtenidos estan representados en las figuras 4.10 y 4.11. En la primera es posible observar la tendencia de adhesión

bacteriana sobre las diferentes superficies con respecto a la rugosidad, evidenciando en primer lugar una separación con respecto al tipo de tratamiento, es decir la superficie Smooth y las superficies granalladas. Este último grupo, muestra un incremento en el número de bacterias proporcional al aumento de la rugosidad, tanto para el número total de bacterias adheridas (Figura 4.10-A), como el número de UFC/mm<sup>2</sup> (Figura 4.10-B). Mientras que la superficie Smooth, presento un mayor número de bacterias adheridas comparadas tanto con las superficies Al2 como con las superficies SI2.

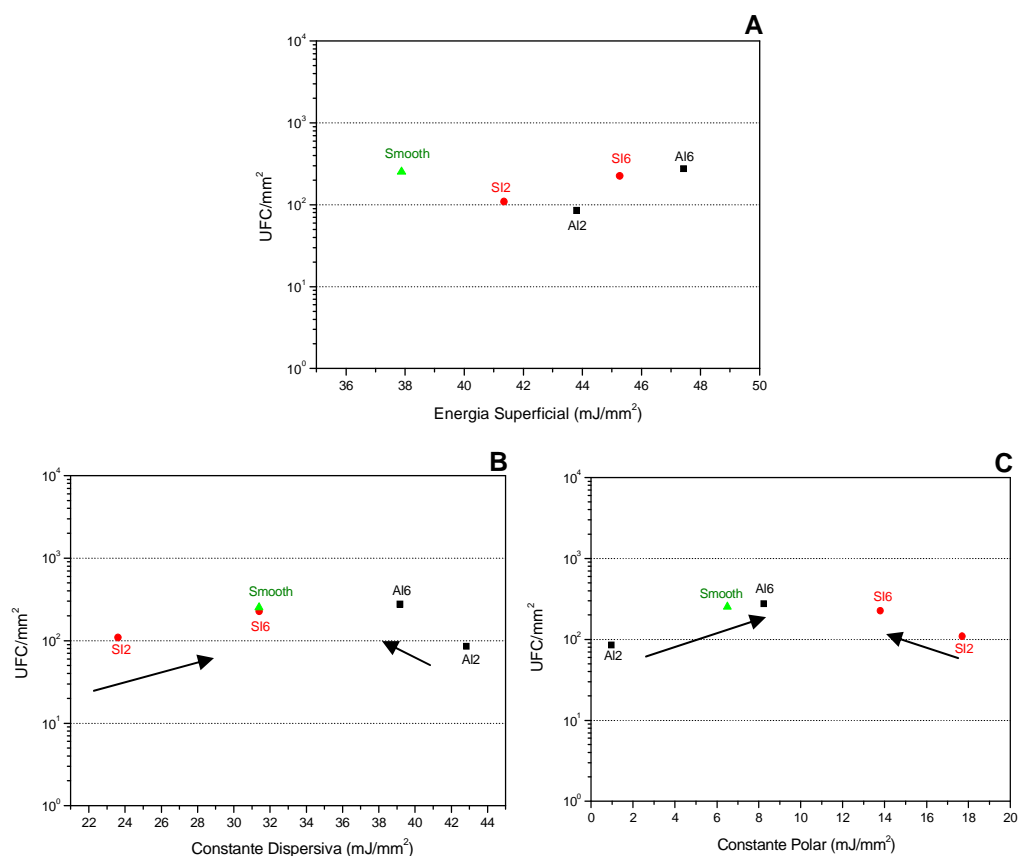
Cuando estos valores se graficaron vs la energía de superficie (así como vs sus componentes dispersiva y polar) (Figura 4.11), fue posible observar como la tendencia lineal observada previamente cuando los resultados se representaron vs la rugosidad comienza a perderse, evidenciándose un comportamiento asociado al tipo de partícula empleado en el proceso de granallado. Esta diferencia se puso de manifiesto cuando se representaron vs constante dispersiva (B) y polar (C), ya que cuando la constante dispersiva aumentó en superficies con carburo de silicio, un incremento en el número de bacterias se observó; mientras que en el caso de las superficies tratadas con alúmina, conforme este valor aumento, el número de UFC/mm<sup>2</sup> disminuyó. En este caso en particular pudo observarse que la constante dispersiva de Smooth y SI6 son iguales y al mismo tiempo la cantidad de UFC por unidad de área fue igual para las dos superficies.



**Figura 4.10.** Cantidad de bacterias (*S. sanguinis* inoculadas previamente en saliva artificial modificada) adheridas sobre las diferentes superficies de titanio graficados contra la rugosidad. En A están representadas (en el eje y) el número total de bacterias cuantificadas sobre los discos de titanio, mientras que en B, esta representado el número de UFC/mm<sup>2</sup> denotando la misma tendencia.

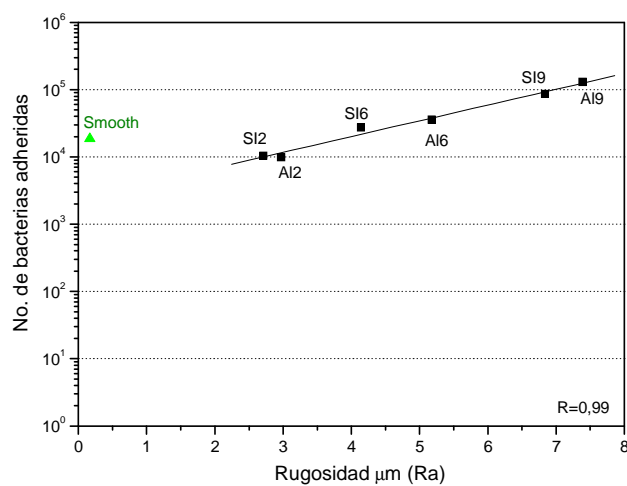
Al mismo tiempo, cuando estos valores se representaron vs la constante polar, pudo observarse como en el caso de las superficies granalladas con carburo de silicio

el número de UFC/mm<sup>2</sup> disminuyo cuando este valor aumento, y en el caso de las superficies granalladas con alúmina, conforme aumentaba el valor de esta constante el número de bacterias por unidad de área aumentaba también.



**Figura 4.11.** Número de UFC/mm<sup>2</sup> (*S. sanguinis* previamente inoculada en MSAM) adheridas sobre las superficies de titanio, en este caso se representaron vs la energía superficial total (A), su componente dispersiva (B) y su componente polar (C).

De igual forma que en el capítulo anterior, se realizaron nuevos ensayos de adhesión de *S. sanguinis* inoculada en MSAM, incorporando las superficies SI9 (granallada con carburo de silico) y Al9 (granallada con alúmina). Los resultados se pueden observar en la figura 4.12, donde se aprecia claramente el incremento en el número de bacterias por unidad de área denotando una tendencia lineal, ya que conforme la rugosidad aumenta, la cantidad de UFC/mm<sup>2</sup> lo hace también sobre las superficies granalladas.



**Figura 4. 12** Ampliación de la curva de No. de bacterias (*S. sanguinis* inoculado en MSAM) vs rugosidad.

#### 4.5. DISCUSION

Nuestros resultados demuestran que las modificaciones realizadas a la saliva artificial (con una composición comúnmente empleada para el tratamiento de pacientes con Xerostomía), promueve el crecimiento y desarrollo de *S.sanguinis* (el cual presentó una curva de crecimiento muy similar a la obtenida en Todd-Hewitt), no así para *L. salivarius*. Ya que los valores de células viables en el medio ( $10^6$ ), estaban dentro del número de bacterias adheridas por unidad de área obtenidas en el capítulo anterior ( $10^4$ ), se decidió realizar los mismos experimentos de adhesión bacteriana sobre superficies de titanio con ambas cepas.

Para esta serie de ensayos se trabajó inicialmente sólo con las muestras más representativas de cada tipo de tratamiento, es decir la muestra Smooth (como control negativo de adhesión bacteriana), AI2 (por presentar los valores más bajos de UFC/mm<sup>2</sup> en el capítulo anterior) y SI2 (por tener un valor de rugosidad similar a AI2, pero granallada con una partícula diferente). Las imágenes de MEB, muestran la presencia de ambas bacterias sobre las superficies de titanio, mientras que las cuantificaciones de adhesión con *S. sanguinis* en la saliva artificial modificada muestran que por un lado, el número de bacterias por unidad de área y la tendencia en cuanto el tipo de partícula fue muy similar en cada muestra comparada con los resultados en Todd-Hewitt (capítulo 3) y por otro lado, se observó el mismo comportamiento, donde la superficie AI2 presentó nuevamente un menor número de bacterias al ser comparada con la superficie SI2 e incluso con Smooth.

Al mismo tiempo los resultados obtenidos con *L. salivarius*, presentaron un comportamiento totalmente diferente a los observados en MRS, ya que los valores de adhesión obtenidos, fueron mayores (en este caso, dentro del mismo orden de magnitud que *S. sanguinis* en MSAM, como se observan en las figuras 4.8 y 4.9) y la tendencia fue completamente opuesta, ya que sobre la superficie Smooth (con un Ra de ~100 nm) se cuantificaron la mayor cantidad de UFC/mm<sup>2</sup>, en comparación con las superficies rugosas.

En el caso de *L. salivarius*, el incremento en el número de UFC/mm<sup>2</sup> en la superficie Smooth en comparación con los resultados observados en el capítulo anterior con la misma superficie, puede deberse a las diferentes viscosidades de los diferentes medios, ya que para MRS el valor de viscosidad fue de  $0,89 \pm 0,2$  mPa/s

(36,5 °C), mientras que para la saliva artificial modificada (MSAM) fue de  $23,7 \pm 2$  mPa/s (36,5 °C). De acuerdo con Greenet, un incremento en la viscosidad de un fluido, disminuirá los movimientos propios de una bacteria en un ambiente acuoso (movimiento Browniano) [GRE77], estos movimientos son los que aproximan a la bacteria a la superficie, ralentizando estos movimientos puede ser un factor de ayuda a la congregación de las bacterias a la superficie. Mientras que en el caso de la superficie SI2, la cantidad de bacterias por unidad de área fue similar a las obtenidas en el capítulo anterior.

Como se menciona anteriormente, se incorporaron muestras con mayor rugosidad de cada tipo de tratamiento de granallado (alúmina y carburo de silicio) para estudiar el efecto de estas partículas en el comportamiento de adhesión de *S. sanguinis*. Los resultados de adhesión bacteriana representados vs la rugosidad (tanto con el número de bacterias adheridas, como con la cantidad de UFC/mm<sup>2</sup>), muestran el comportamiento de adhesión de estas bacterias, las cuales presentaron una tendencia exponencial, incrementando la cantidad de bacterias conforme el valor de la rugosidad aumentaba. En este caso, no se observó una separación por tipo de partícula empleada en el proceso de granallado como en el capítulo anterior. La posible causa de esta diferencia, tanto en tendencia como en cantidad de bacterias adheridas, puede estar asociada a la diferencia en composición de los medios empleados. Por un lado el medio Todd-Hewitt contiene los iones Na<sup>+</sup>, P y Cl<sup>-</sup> (Tabla 3.2), mientras que la saliva artificial modificada, presenta una variedad más amplia de iones: Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> (Tabla 4.1).

Esta diferencia en cuanto a la composición de los medios, puede que tenga influencia en el comportamiento de adhesión, ya que en la capa adsorbida de agua sobre el titanio, se encuentran disueltos iones que interactuarán con la superficie tanto del material como con la de la bacteria (pared celular) y de igual forma, la capa de agua que se encuentra en íntimo contacto con la bacteria, cambiara las propiedades de superficie de esta influyendo en su comportamiento de adhesión. [WUB88] Esto se observa claramente tanto en *S. sanguinis* como en *L. salivarius*, ya que en ambos casos, el comportamiento de adhesión es diferente comparados con los resultados del capítulo anterior, donde la única diferencia entre cada ensayo es el medio en el cual se ha inoculado a ambas bacterias.

Sheng y colaboradores han determinado la influencia de nutrientes, iones y pH de una solución, influye en la interacción bacteria-superficie metálica, debido a la

formación de una delgada capa con trazas orgánica, la cual reduce la mojabilidad de la superficie. Pero al mismo tiempo, el incremento en la cantidad de iones en la solución incrementara la fuerza de adhesión bacteriana a una superficie metálica, debido a un aumento en las fuerzas de atracción electrostáticas. [SPT08] Y de acuerdo con Yang y colaboradores, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son un prerequisite para la unión inter-especies entre algunos tipos de bacterias de los llamados colonizadores primarios como *S. sanguinis* y *Actinomyces naeslundii*, pero al mismo tiempo, la presencia de este ión entre un mismo tipo de bacterias, parece disminuir su comportamiento de agregación. [YBB01]

Todo esto de manera grafica, puede observarse, al representar los valores de adhesión de *S. sanguinis* ( $\text{UFC}/\text{mm}^2$ ) inoculada en MSAM vs la energía superficial, ya que la tendencia exponencial observada en un principio, comienza a perderse. Pero la separación por tipo de partícula se evidencia cuando se representan las  $\text{UFC}/\text{mm}^2$  vs la constante dispersiva y polar, ya que cuando el valor de la constante dispersiva aumenta, en las superficies granalladas con carburo de silicio, la cantidad de  $\text{UFC}/\text{mm}^2$  aumenta y en el caso de las superficies granalladas con alúmina, el número de bacterias disminuye conforme aumenta el valor de esta constante. Y en el caso de la constante polar se observa como la cantidad de bacterias aumenta conforme este valor incrementa, para la superficie granallada con alúmina; mientras que en las superficies granalladas con carburo de silicio la cantidad de bacterias disminuye, conforme aumenta el valor de la constante polar.

Los resultados de este capítulo y el anterior corroboran que el tipo de partícula empleada para la obtención de la rugosidad influye en las propiedades de superficie, lo que directamente afectará al comportamiento de adhesión bacteriana. Por otro lado el tipo de medio empleado en los ensayos de adhesión bacteriana, tendrá una influencia primordial en dicho comportamiento debido a la composición electrolítica, diferencias en pH y presencia de material orgánico, las cuales cambiaran las propiedades físico-químicas de la superficie tanto de la bacteria como de la superficie estudiada, por lo que los resultados de adhesión bacteriana con MSAM al ser comparados con los de adhesión en Todd-Hewitt, nos indican que este medio puede ser empleado para ensayos de adhesión bacteriana *in vitro*, ofreciendo varias ventajas. Por un lado mayor reproducibilidad, al utilizar un medio con una composición bien establecida y que se aproxima a la composición electrolítica de la saliva humana (evitando el uso de saliva humana como en otros ensayos [MPM04] [GGH01]) disminuyendo las variables inherentes al uso de saliva humana. Además, permite hacerle las modificaciones necesarias para promover el crecimiento de cualquier cepa bacteriana.





#### 4.6. CONCLUSIONES

De este capítulo podemos concluir:

- La saliva artificial modificada (MSAM) empleada en este trabajo de tesis, puede ser utilizada en ensayos de adhesión de bacterias, ya que por un lado promueve el crecimiento bacteriano de *S. sanguinis* (colonizador primario) y por otro se asemeja mejor a la composición de la saliva humana.
- De manera similar que en el capítulo anterior, se pudo observar que la adhesión bacteriana no estuvo directamente relacionada con la rugosidad, ya que tanto las superficies granalladas (AI2 y SI2) como la superficie Smooth, presentaron valores similares de adhesión bacteriana.
- El tipo de tratamiento superficial utilizado para aumentar la rugosidad en las superficies de titanio, influirá en la respuesta de adhesión de las bacterias.
- Por otro lado, nuestros resultados corroboran lo observado en el capítulo anterior, donde las muestras que fueron granalladas con alúmina (en esta caso AI2) presentaron un menor número de bacterias adheridas por unidad de área, pudiendo ser una buena opción entre una baja cantidad de bacterias adheridas por unidad de área y la rugosidad necesaria para aumentar el área de contacto entre el tejido gingival y la superficie del implante (formando el sellado biológico).

#### 4.7. REFERENCIAS

- [BLQ97] Bollen C.M., Lambrechts P., Quirynen M. *Comparison of surfaces roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature*. Dental Materials 13 (1997) 258-269.
- [BPV96] Bollen C.M., Papaioannou W., van Eldere J., Schepers E., Quirynen M., van Steenberghe D. *The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis*. Clinical Oral Implants Research 7 (1996) 201-211.
- [ETH93] Elagli K., traisnel M., Hilderbrand H.F., *Electrochemical behaviour of titanium and dental alloys in artificial saliva*, Electrochimica Acta, 38 (1993) 1769-1774
- [FSL07] Fürst Mirjam M., Salvi Giovanni E., Lang Niklaus, Persson G. Rutger, *Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants*. Clinical Oral Implant Research, 18 (2007) 501-508.
- [GGH01] Grössner-Schreiber Birte, Griepentrog Michael, Haustein Ingrid, Müller Wolf-Dieter, Lange Klaus-Peter, Briedigkeit Helga, Göbel Ulf Berthold, *Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study*. Clinical Oral Implant Research, 12 (2001) 543-551.
- [GRE77] Greenberg EP., Canale-Parola E., Motility of flagellated bacteria in viscous environments. Journal of Bacteriology, 132 (1977) 356-358.
- [GWM06] Gerber Jeanne, Wenaweser Doris, Mayfield-Heitz Lisa, Lang Niklaus P., Persson G. Rutger, *Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods*. Clinical Oral Implant Research, 17 (2006) 1-7.
- [HHH03] Her-Hsiung Huang, Yu-Hui Chiu, Tzu-Hsin Lee, Shih-Ching Wu, Hui-Wen Yang, Kuo-Hsiung Su and Chii-Chih Hsu, *Ion release from NiTi orthodontic wires in artificial saliva with various acidities*. Biomaterials, 24 (2003) 3585-3592.
- [HKW07] Hauser-Gerspach Irmgard, Kulik Eva M., Weiger Roland, Decker Eva-Maria, Von Ohle Christiane and Meyer Jürg, *Adhesion of Streptococcus sanguinis to Dental Implant and Restorative Materials in vitro*. Dental Materials Journal 26, (2007) 361-366.
- [JLH89] Johansson B.I., Lemons J.E., Hao S.Q., *Corrosion of dental copper, nickel and gold alloys in artificial saliva and saline solutions*. Dental Materials, 5 (1989) 324-328.
- [KOL93] Kolenbrander Paul E. and London Jack, *Adhere today, here tomorrow: Oral bacterial adherence*. Journal of Bacteriology, 175 (1993) 3247-3252
- [LHS04] Länge Kerstin, Herold Martin, Scheideler Lutz, Geis- Gerstorfer Jürgen , Wendel Hans-Peter, Gauglitz Günter, *Investigation of initial pellicle formation on modified titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) surfaces by reflectometric interference spectroscopy (RIFS) in a model system*. Dental Materials, 20 (2004) 814-822.
- [LMT75] Listgarten M.A., Mayo H.E., Tremblay R., *Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man*. Journal of Periodontology 46 (1975) 10-25.
- [MAL90] Mallakh B.F., Sarkar N.K., *Fluoride release from glass-ionomer cements in de-ionized water and artificial saliva*. Dental Materials, 6 (1990) 118-122
- [MPM04] Mabboux Florence, Ponsonnet Laurence, Morrier Jean-Jacques, Jaffrezic Nicole, Barsotti Odile. *Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials-an in vitro study*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 39 (2004) 199-205.

- [PRE05] Preetha A. and Banerjee R., *Comparison of Artificial Saliva Substitutes*. Trends in Biomaterials and Artificial Organs, 2 (2005) 178-186.
- [QBP96] Quirynen M., Bollen C.M., Papaioannou W., van Eldere J., van Steenberghe D. *The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations*. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 11 (1996) 169-178.
- [QUI93] Quirynen M., van Steenberghe D. *Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study*. Clinical Oral Implants Research 4 (1993) 15 8-161.
- [SVA95] Schenkels L., Veerman E., Amerongen A. *Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids*, Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 6, (1995) 161-175.
- [SIS97] Sissons C.H., *Artificial Dental Plaque Biofilm Model Systems*, Advances in Dental Research, 11 (1997) 110-126.
- [SPT08] Sheng X., Ting Y., Pehkonen S., The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. Journal of Colloid and Interface Science, 321 (2008) 256-264.
- [SSK98] Steinber Doron, Sela Michael N., Klinger Avigdor, Kohavi David, *Adhesion of periodontal bacteria to titanium and titanium alloy powders*, Clinical Oral Implant Research, 9 (1998) 67-72.
- [STO07] Stokes J. and Davies G. Viscoelasticity of human whole saliva collected after acid and mechanical stimulation. Biorheology 44 (2007) 141-160.
- [SWS98] Sissons C.H., Wong L., Shu M. *Factors affecting the resting pH of in vitro human microcosm dental plaque and Streptococcus mutans biofilms*, Archives of Oral Biology, 43 (1998) 93-102.
- [TVS06] Teughels W., van Assche N., Sliepen I., Quirynen M. *Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development*, Clinical Oral Implants Research, 17 (2006) 68-81.
- [WON01] Wong L. and Sissons C. H. *A comparison of human dental plaque microcosm biofilms growth in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva*. Archives of Oral Biology, 46 (2001) 477-486.
- [WON07] Wong Lisa, Sissons Chris H. *Human dental plaque microcosm biofilm: effect of nutrient variation on calcium phosphate deposition and growth*. Archives of Oral Biology 52, (2007) 280-289.
- [WUB88] Weerkamp A., Uyen H., Busscher H., Effect of Zeta Potential and Surface Energy on Bacteria Adhesion to Uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. Journal of Dental Research, 67 (1988) 1483-1487.
- [YBB01] Yang J., Bos R., Belder G., Busscher H., Co-adhesion and removal of adhering bacteria from salivary pellicles by three different modes of brushing. European Journal of Oral Science 109 (2001) 325-329.